



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2009

**Maria Teresa Calixto
Ribeiro Claro**

**Ferramentas de genotipagem para estudos
populacionais em dafnídeos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Bruno Branco Castro, investigador auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro, e do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, investigador auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais por me terem ensinado a acreditar.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
professora auxiliar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Eduardo Mendes da Silva
professor associado I, Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia

Prof. Doutora Isabel da Silva Henriques
professora auxiliar convidada, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Bruno Branco Castro (orientador)
investigador auxiliar do CESAM, Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves (co-orientador)
investigador auxiliar do CESAM, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao Professor Doutor Fernando Gonçalves pela oportunidade que me deu de pertencer ao seu grupo de trabalho e às condições e meios que disponibilizou para a realização do meu trabalho. Obrigado pela simpatia e ajuda, mesmo não sendo um dos orientador formais.

Ao Doutor Bruno, agradeço todo o apoio, amizade, sabedoria e disponibilidade que me acompanhou ao longo deste ano. Agradeço também a independência que me concedeu, o respeito pelas minhas ideias e a confiança que depositou em mim ao longo de todo o trabalho. Tenho também de agradecer a motivação constante, a orientação e as críticas sempre construtivas.

Agradeço também ao Doutor Artur Alves pela disponibilidade que sempre teve para me orientar e para as minhas dúvidas. Agradeço o tempo despendido e a paciência.

Um obrigado a toda a equipa coordenada pelo Professor Doutor António Correia, pelo apoio e simpatia que sempre demonstraram. Este trabalho também não teria sido possível sem o suporte técnico do laboratório coordenado pela Professora Doutora Maria da Conceição Santos, a quem também agradeço toda a ajuda.

Muito obrigado a todos os colegas do LEADER por terem estado sempre lá, pelo apoio, simpatia, amizade, conversas, partilha, gargalhadas e paciência. Foi um prazer conhece-los a todos e aprender com todos eles.

Agradeço também às companheiras dos últimos anos: Maria João, Elisabete, Joana e Marta, pela amizade e cumplicidade. E um obrigado já com mais de 20 anos à Isabel pela bela amizade que tanto orgulho e apoio me dá em todos os momentos.

Ao meu companheiro de vida e melhor amigo, Daniel, agradeço todo o amor, carinho e boa disposição. Obrigado pelo interesse no meu trabalho e pela paciência para me ouvir contar cada passo que dou e cada conclusão a que chego.... Obrigado por, mesmo longe, me apoiar e fazer acreditar que sou capaz de tudo.

Por fim, agradeço a toda a minha família (e à Paula e ao João André, porque afinal de contas pertencem à família do coração) pelo interesse e apoio no meu trabalho. Um enorme obrigado aos meus pais pela sua presença, por manterem a minha sanidade mental, por todo o apoio, por me ouvirem e por me terem feito chegar até aqui. Obrigado aos dois por serem o modelo que são. Tenho orgulho em poder dizer que são dois dos meus melhores amigos. Muito obrigado por tudo.

palavras-chave

Daphnia, *Simocephalus*, genética populacional, genotipagem, MSP-PCR

resumo

Os dafnídeos representam organismos-modelo importantes em diversas áreas como limnologia, ecotoxicologia, genética ecológica e, recentemente, em genómica. Contudo, as suas relações filogenéticas e a sua taxonomia são ainda bastante controversas, sendo a identificação destes organismos dificultada pela elevada plasticidade fenotípica que apresentam e a existência de fluxo de genes entre *taxa*, via hibridação e retrocruzamentos. Com o objectivo de ultrapassar as ambiguidades dos critérios morfológicos para a diferenciação de espécies, têm vindo a ser desenvolvidas, ao longo do tempo, várias ferramentas moleculares, como a electroforese de alozimas, RFLP e RAPD. Este tipo de ferramentas moleculares possui também grande utilidade para estudos de dinâmica populacional, ao permitir um maior grau de resolução na compreensão da extensão e rapidez das alterações da estrutura populacional. Neste trabalho, a técnica de MSP-PCR (*microsatellite-primed polymerase chain reaction*), utilizada com sucesso na diferenciação de outros organismos, foi optimizada e aplicada em populações naturais de *Daphnia longispina*. Comparando com outras ferramentas moleculares, esta técnica apresenta vantagens como a sua simplicidade, a eficácia, e os baixos custos e necessidades técnicas. Posteriormente, as técnicas desenvolvidas foram aplicadas a diversas populações de *Simocephalus*, com o objectivo de analisar a variação genética ao nível do genótipo. Os resultados obtidos demonstraram a utilidade destas ferramentas na identificação genética de linhagens clonais cultivadas em laboratório, revelando contudo uma grande variabilidade associada à técnica e a necessidade de optimização da mesma. Com este trabalho, perspectivam-se elevadas potencialidades na utilização regular desta técnica em estudos de genética de populações naturais de Daphniidae.

keywords

Daphnia, *Simocephalus*, population genetics, genotyping, MSP-PCR

abstract

Daphniids represent important model-organisms in different areas, such as limnology, ecotoxicology, ecological genetics and, recently, genomics. However, their phylogenetic relationships and taxonomy are still very controversial. The identification of *Daphnia* species is still somewhat ambiguous, because of high phenotypic plasticity and gene flow between *taxa*, via hybridization and backcrosses. Aiming at overcoming the ambiguities of morphological criteria for species differentiation, several molecular tools have been developed through time, such as allozyme electrophoresis, RFLP, and RAPD. Such molecular tools can also be used in population dynamics studies, allowing a high resolution degree on our understanding of the extent and speed of population structure changes. In this work, an MSP-PCR technique (*microsatellite-primed polymerase chain reaction*), which has been used successfully on the differentiation of other organisms, was optimized and applied in natural populations of *Daphnia longispina*. Comparing with other molecular tools, this technique presents advantages, such as its simplicity, efficacy, and low cost and technical requirements. In a second phase of the work, the developed techniques were applied to *Simocephalus* populations, with the goal of analysing the genetic variation at the genotype level. Our results have shown the usefulness of these molecular tools in the genetic identification of clonal lineages reared in laboratory, showing however a large variability associated with the technique and the need to optimize it. This work revealed a high potential for the regular use of these markers on genetic studies in natural populations of Daphniidae.

Índice

Introdução Geral	1
Introdução	3
Referências Bibliográficas	16
Capítulo 1	21
Optimização da técnica de MSP-PCR	
Introdução	23
Material e métodos	25
Resultados e Discussão	30
Referências Bibliográficas	35
Capítulo 2	37
MSP-PCR como ferramentas de genotipagem em populações de dafnídeos	
Introdução	39
Material e métodos	42
Resultados	46
Discussão	57
Referências Bibliográficas	62

Introdução geral

Introdução

Os organismos da família Daphniidae, mormente os pertencentes ao género *Daphnia*, são o maior componente da comunidade zooplanctónica de água doce em todo o mundo, tendo sido alvo de grande interesse por parte dos limnologistas (Hebert 1978). Ao longo do tempo, têm vindo também a tornar-se organismos-modelo importantes em ecotoxicologia, genética ecológica e, recentemente, em genómica (Lynch & Spitze 1994). Isto deve-se ao facto de apresentarem uma distribuição geográfica ubíqua, representarem espécies chave em cadeias tróficas, e ocorrerem em todos os *habitats* de água doce (Benzie 2005, Brede *et al.* 2006). Estes microcrustáceos são animais fáceis de criar em laboratório, e representam animais experimentais ideais devido ao seu modo principal de reprodução (partenogénese cíclica¹, ver abaixo) (Brede *et al.* 2006). O seu ciclo de vida extremamente rápido e a possibilidade de isolar linhagens geneticamente distintas durante várias gerações permitem aos investigadores conduzir experiências e testar hipóteses em ecologia e biologia evolutiva, que são logisticamente impossíveis de explorar em organismos mais complexos.

Ecologia alimentar e posição trófica

A alimentação destes microcrustáceos é normalmente feita através da filtração de algas, bactérias, fungos, protozoários, e restos orgânicos, estando o tamanho máximo das partículas ingeridas directamente relacionado com o tamanho dos dafnídeos (Hebert 1978). Nadin-Hurley & Duncan (1976) descobriram que o item principal da dieta dos indivíduos do género *Daphnia* consistia em restos orgânicos, tendo as algas uma maior importância durante as florescências ocasionais. Em adição à sua condição de filtrador, ocasionalmente *Daphnia* também se alimenta directamente do sedimento do fundo do lago (Hebert 1978). Esta eficiência enquanto filtradores leva a um elevado impacto destes microcrustáceos sobre o fitoplâncton, pois torna-os capazes de reduzir a

¹ Produção de um organismo a partir de um ovo infertilizado (reprodução assexuada), em que uma fêmea origina descendência constituída apenas por fêmeas sem contribuição genética de um macho.

biomassa algal a níveis extremamente reduzidos, dada a sua tolerância para baixos níveis de alimento (Gliwicz 1990, Kreutzer & Lampert 1999). O género *Daphnia* é especialmente bem conhecido pela sua elevada potencialidade de controlo sobre o fitoplâncton (Scheffer 1998), o que lhe confere um papel de destaque em questões relacionadas com a gestão de lagos e albufeiras ameaçados por elevados níveis de nutrientes e com elevada produtividade primária (eutroficação²). Nestes locais, o papel dos microcrustáceos do género *Daphnia* é mais notório nas zonas pelágicas, desprovidas de vegetação; outros dafnídeos, como por exemplo os organismos do género *Simocephalus*, surgem com maior relevância nas zonas litorais e na presença de vegetação (Alonso 1996). A importância do zooplâncton (como *Daphnia* e *Simocephalus*) reside igualmente no seu papel central na transferência de massa e energia ao longo da cadeia trófica pelágica, já que ocupa uma posição de charneira enquanto herbívoro e, simultaneamente, presa da maior parte das espécies de peixes de água doce (Scheffer 1998, Castro 2007).

Reprodução

Regra geral, estes organismos alternam entre dois tipos de reprodução: assexuada (partenogénese) e sexuada (Hebert 1978). Enquanto as condições ambientais se mantêm favoráveis para estes organismos, os indivíduos reproduzem-se assexuadamente, originando várias linhagens clonais constituídas apenas por fêmeas. Quando as condições ambientais tendem a tornar-se desfavoráveis (p.e. densidades elevadas da população, redução do nível da água, presença de predadores, redução dos recursos alimentares), a população altera o seu modo reprodutivo para reprodução sexuada. Os machos (resultantes de reprodução assexuada) surgem na população e as fêmeas produzem ovos sexuados que necessitam de ser fertilizados pelo esperma masculino (De Meester *et al.* 2006).

² Acumulação excessiva de nutrientes inorgânicos e/ou matéria orgânica num ecossistema aquático, o que induz um elevado crescimento de algas fitoplanctónicas e macrófitas e, portanto, uma maior produtividade primária e, geralmente, a uma diminuição do volume total do ecossistema.

A reprodução sexuada em dafnídeos resulta em um ou dois ovos sexuados por fêmea, designados ovos de resistência, que ficam protegidos por várias membranas protectoras no interior da carapaça (exosqueleto) da mãe. A esta estrutura composta pelo invólucro protector e pelos ovos de resistência inclusos dá-se o nome de *ephippium*. Aquando da ecdise (muda), a mãe liberta esta estrutura com a restante carapaça. As *ephippia* são resistentes à dessecação, enzimas digestivas, e congelamento, sendo cruciais para assegurar a sobrevivência das populações residentes. Normalmente, estes ovos entram em diapausa³, mas alguns desenvolvem-se imediatamente, dando origem a novas fêmeas (Hebert 1978). Durante a diapausa, estas estruturas de resistência podem afundar, flutuar e serem transportadas pelo vento para outras zonas do lago, ou sofrerem transporte passivo nas penas, pêlos, e estômagos de vertebrados (as aves adquirem particular importância, pois podem transportar *ephippia* por longas distâncias). Este transporte passivo assegura o fluxo de genes entre populações com um grau de isolamento elevado, como é o caso da maioria dos sistemas lênticos⁴ (charcos, lagos, e albufeiras).

Quando as condições são favoráveis, nomeadamente no final do Inverno, com o aumento da temperatura e da duração do dia, dá-se a eclosão das *ephippia* a partir do banco de ovos viáveis existente no fundo dos lagos e albufeiras. Este reservatório de ovos representa um capital genético importante, já que incorpora ovos de resistência produzidos em anos e períodos distintos (Hairston 1996). Cada ovo de resistência que eclode origina um indivíduo (fêmea) geneticamente único (i.e. uma nova linhagem clonal), uma vez que resulta de reprodução sexuada (Schwartz & Hebert 1987, De Meester *et al.* 2006). A existência de reprodução sexuada não implica necessariamente o fim da reprodução assexuada, pois ambas podem ocorrer ao mesmo tempo, especialmente se o ambiente em redor for imprevisível (De Meester *et al.* 2006). A ocorrência de gerações formadas por reprodução sexuada e assexuada tem consequências para a sustentação da diversidade genética e para a estrutura genética da população (De Meester *et al.* 2006).

³ Período de dormência no ciclo de vida de um organismo.

⁴ Habitats de água doce, como charcos, lagos e albufeiras, onde há ausência de um fluxo unidireccional significativo da massa de água.

Dinâmica populacional

Em organismos que produzem estruturas dormentes, como muitas plantas e animais aquáticos, as sementes estratificadas e os bancos de ovos existentes no solo ou sedimento providenciam uma alternativa e um registo real facilmente acessível à história da população (Vavrek *et al.* 1991, Hairston *et al.* 1999). Os ovos de resistência de *Daphnia* (ver acima) têm sido utilizados com sucesso na reconstrução das alterações ocorridas na composição de populações deste *taxon* durante períodos de tempo evolutivamente relevantes (Hairston *et al.* 1999). A eclosão de ovos de resistência garante a entrada cíclica de novos genótipos na população. Estes novos genótipos competem entre si levando à formação de uma taxocenose bastante dinâmica. As populações que constituem esta taxocenose estão sob influência de forças selectivas, podendo a estrutura genética de uma população ser afectada por parasitas (Duncan & Little 2006), predadores (Hairston *et al.* 1999), ou outras fontes de alteração ambiental (natural ou induzida pelos humanos).

No início da fase de crescimento (quando as populações são restabelecidas a partir do banco de ovos de resistência), é expectável uma elevada diversidade genética; contudo, a dominância da reprodução partenogenética na fase subsequente causa um decréscimo da diversidade clonal devido à selecção natural. Esta erosão clonal (perda de clones ao longo do tempo) produz um forte impacto na estrutura genética da população (De Meester *et al.* 2006, Hembre & Megard 2006), e depende do(s) agente(s) de selecção que actuam naquele momento (predação, competição, contaminação).

Também a introgressão (fluxo de genes entre espécies, via cruzamentos híbridos e retrocruzamentos) contribui para a variação genética dentro das populações (ver abaixo), sobretudo em populações predominantemente partenogenéticas, como é o caso dos dafnídeos. Por sua vez, a plasticidade fenotípica característica dos dafnídeos é frequentemente considerada um limitador da selecção natural, por não permitir os efeitos desta. No entanto, estudos recentes demonstram que esta plasticidade representa uma componente fundamental das alterações evolutivas (Behera & Nanjundiah 2004). Adicionalmente, a composição genética das populações residentes pode

condicionar o sucesso de estabelecimento dos genótipos imigrantes (De Meester *et al.* 2007). Processos microevolutivos associados com a adaptação genética local ou com o fluxo massivo de genes podem levar a um impacto significativo na formação da comunidade (Slatkin 1987, De Meester *et al.* 2007).

A conjugação de todos estes factores promove flutuações significativas na composição genética e sub-estrutura das populações de dafnídeos. Estas flutuações resultam da conjugação da competição entre genótipos, mas também da acção de agentes de selecção extrínsecos, como a predação ou os xenobióticos. O estudo da dinâmica populacional dos dafnídeos requer, por isso, o emprego de ferramentas moleculares (ver mais abaixo) que permitam um maior grau de resolução na compreensão da extensão e rapidez das alterações da sub-estrutura populacional destes microcrustáceos.

Taxonomia, plasticidade fenotípica e hibridação

Embora os dafnídeos representem os microcrustáceos melhor estudados, as suas relações filogenéticas e a sua taxonomia são ainda bastantes controversas (Schwenk *et al.* 2000, Billiones *et al.* 2004). Inconsistências nomenclaturais, como por exemplo o uso de nomes taxonómicos em diferentes regiões geográficas, continuam a dificultar análises comparativas, e limitam o uso de informação acumulada na literatura e bases de dados públicas (Petrusek *et al.* 2008). No caso específico do género *Daphnia*, a identificação torna-se especialmente difícil devido a duas características já referidas: plasticidade fenotípica da sua morfologia e fluxo de genes entre *taxa*, via hibridação e retrocruzamentos (Billiones *et al.* 2004; Benzie 2005; Petrusek *et al.* 2008).

Os dafnídeos apresentam elevados níveis de plasticidade morfológica, a qual por vezes reflecte alterações sazonais no ambiente, um fenómeno conhecido por ciclomorfose (Hebert 1978, Reid *et al.* 2000, Lass & Spaak 2003). As alterações morfológicas podem ir desde a expansão dorsoventral da cabeça de modo a que uma crista laminada seja formada, a redução da largura do corpo, ou o aumento do comprimento do espinho caudal, consoante o estímulo e a espécie considerada. Esta plasticidade pode levar a uma drástica alteração na sua aparência (Hebert 1978).

A especiação por hibridação é comum na natureza, ocorrendo em plantas e animais (Schultz 1969, Giessler 1997). Nos casos em que a hibridação se conjuga com a reprodução assexuada ou reprodução por partenogénese, o posicionamento taxonómico aumenta a sua complexidade (Cole 1985). A hibridação tem sido documentada em várias espécies de cladóceros, em diferentes continentes (Hann 1987). Os cladóceros do género *Daphnia* apresentam a capacidade de produzir híbridos inter-específicos, retrocruzamentos (i.e. cruzamentos entre híbrido e espécie parental) e híbridos F2 (cruzamentos entre híbridos, exibindo várias classes recombinantes), através da reprodução sexuada (Billiones *et al.* 2004). O fluxo de genes entre espécies leva a novas associações genéticas, que podem ou não resultar em especiação.

As espécies do grupo *Daphnia longispina* (sub-género *Hyalodaphnia*) são uma excelente demonstração da complexidade do fluxo interespecífico de genes (Giessler 1997). Entre as espécies *D. galeata*, *D. longispina*⁵ e *D. cucullata* é por vezes comum a ocorrência de hibridação interespecífica, levando à produção de híbridos com formas corporais intermédias (Reid *et al.* 2000). A coexistência por longos períodos entre as espécies parentais e híbridos só é possível em condições que não só favoreçam as espécies parentais, mas também reforcem as suas capacidades competitivas (Ringelberg *et al.* 2004, Keller *et al.* 2007). A selecção natural determinará o genótipo que será favorecido em cada momento (Spaak & Hoekstra 1995). Os fenótipos dos híbridos reflectem mosaicos de traços morfológicos complexos herdados das espécies parentais. Para além dos componentes nucleares, a morfologia pode ser influenciada por componentes citoplasmáticos transmitidos pela espécie maternal à descendência. Neste caso, os híbridos terão maior similaridade com a espécie maternal (Giessler 2001). A existência de híbridos com formas corporais intermédias, associada à elevada plasticidade fenotípica e às alterações morfológicas consequentes, leva a grandes dificuldades na identificação correcta das diferentes espécies de dafnídeos.

Foram recentemente propostas ferramentas moleculares para identificar as espécies do grupo *D. longispina* com base no padrão de restrição da região ITS

⁵ Uma recente revisão taxonómica engloba neste grupo os nomes *D. hyalina*, *D. longispina*, e *D. rosea*.

(Billiones *et al.* 2004, Skage *et al.* 2007). Esta análise de PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) utiliza enzimas de restrição que reconhecem e cortam pequenas sequências específicas de ADN. Os fragmentos resultantes são separados por electroforese (Conner & Hartl 2004). Diferenças nos padrões de bandas entre indivíduos revelam variação genética no número e posição dos locais de restrição que possuem a sequência específica de ADN reconhecida pela enzima de restrição (Conner & Hartl 2004). Esta técnica foi já aplicada a várias populações europeias de *Daphnia* (Billiones *et al.* 2004, Schwenk *et al.* 2004, Skage *et al.* 2007, Lourenço 2008). Devido ao grau de variação de sequência interespecífica poder ser bastante elevado na região ITS, a técnica de ITS-RFLP tem sido bastante útil na distinção entre espécies muito semelhantes, onde caracteres morfológicos são ambíguos ou falham completamente (Schwenk *et al.* 2000). Lourenço (2008) mostrou a utilidade desta ferramenta ao estudar a população de *Daphnia* presente na lagoa da Vela.

Genética populacional

Durante a última década, os marcadores moleculares têm proporcionado uma nova base para delimitar espécies e análise de linhagens crípticas, o que tem levado a um progresso significativo na compreensão da diversidade dos cladóceros (Forró *et al.* 2008). Dentre os cladóceros, os estudos genéticos em *Daphnia* têm sido alvo de grande atenção, apoiando-se em diferentes técnicas, tais como alozimas (Giessler 1997, Ringelberg *et al.* 2004), RAPD (Schwenk *et al.* 2001, Picado *et al.* 2007), RFLP (Reid *et al.* 2000; Billiones *et al.* 2004; Skage *et al.* 2007), sequenciação de genes mitocondriais (Schwenk *et al.* 2000, Thielsch *et al.* 2009), AFLP (Gili *et al.* 2004), e análise de microsatélites (Thielsch *et al.* 2009). Estes últimos (microsatélites) assumiram-se nos últimos anos como os marcadores por excelência em estudos de dinâmica populacional e na análise de interações genótipo-ambiente (Conner & Hartl 2004).

Os microsatélites são regiões do genoma compostas por um número variável de nucleótidos repetidos (VNTRs – *variable number tandem repeats*), existindo uma grande variação do número de unidades repetidas entre indivíduos (Griffiths *et al.* 1999, Conner & Hartl 2004). As regiões que antecedem e precedem os

microsatélites (*flanking regions*) são sequenciadas, e são desenhados *primers*⁶ complementares de modo a amplificar por PCR⁷ (*polymerase chain reaction*) a região desejada. A diferença no número de repetição de nucleótidos nos diferentes alelos leva a diferenças na migração por electroforese dos fragmentos amplificados (Conner & Hartl 2004). Deste modo, é possível distinguir indivíduos dentro da mesma espécie e assim destrinçar a (sub-)estrutura populacional e estabelecer graus de parentesco. No caso de populações partenogenéticas, como as dos dafnídeos, este nível de resolução permite avaliar a diversidade e composição clonal da população (Brede *et al.* 2006, Thielsch *et al.* 2009).

Thielsch *et al.* (2009) constitui um estudo de referência neste campo, na medida em que utilizou estas ferramentas moleculares de alta resolução em populações naturais de cladóceros (no caso, *D. longispina*). No cômputo geral, as populações estudadas mostravam uma elevada diversidade genética (maior do que estudos anteriores com alozimas), sugerindo uma importância acentuada da fase sexuada (e do banco de ovos de resistência) na dinâmica populacional, e reduzido efeito da selecção clonal na diversidade genética (Thielsch *et al.* 2009). A única excepção foi um lago recentemente colonizado, onde a população de cladóceros exibiu um número reduzido de genótipos, provavelmente como resultado da ausência de um reservatório de *ephippia* pré-existente no sedimento. A utilização deste tipo de ferramentas moleculares permitiu também a observação de uma elevada diferenciação genética entre populações, não apenas à escala continental mas também entre populações vizinhas, tornando mais consistente a hipótese apresentada por De Meester *et al.* (2002); esta hipótese sugere que o rápido crescimento populacional de espécies de cladóceros, o seu potencial para adaptação local, e a monopolização de recursos, levam a uma redução dos níveis de fluxo de genes entre as populações, acentuando a sua diferenciação genética (De Meester *et al.* 2006, Thielsch *et al.* 2009). Deste modo, estas evidências confirmam a ideia de que os lagos de água doce se portam como ilhas, do ponto

⁶ Pequena sequência de ADN ou ARN que, ao ligar-se à cadeia que lhe serve de molde, actua como iniciador para a síntese de uma nova cadeia de ADN ou ARN, a qual é sintetizada a partir da extremidade 3' do primer.

⁷ Método de amplificação de segmentos específicos de ADN que explora certas características da replicação de ADN, e que faz uso de ADN polimerases estáveis a altas temperaturas.

de vista de isolamento genético das populações de cladóceros que aí habitam; mais, a sua dinâmica e estrutura populacional dependem fundamentalmente do banco genético de ovos de resistência existente nos sedimentos. Previsivelmente, daqui resultará uma dinâmica populacional extremamente variável em termos temporais (Thielsch *et al.* 2009), e dependente de vários factores locais.

Marcadores moleculares

Os primeiros marcadores moleculares utilizados em genética de populações foram proteínas, geralmente enzimas solúveis, também conhecidas por alozimas ou isozimas (Conner & Hartl 2004). Também entre os dafnídeos, a técnica mais utilizada inicialmente na identificação de espécies de *Daphnia* e híbridos foi a electroforese de alozimas (Giessler 1997, Keller & Spaak 2004). Uma vantagem da electroforese de alozimas em comparação com outros marcadores é a produção, em muitos casos, de marcadores codominantes (nenhum alelo é dominante sobre os outros), sendo possível distinguir heterozigóticos de ambos os homozigóticos (Conner & Hartl 2004). No entanto, esta técnica apresenta diversas desvantagens relacionadas com o facto da electroforese de enzimas analisar o fenótipo enzimático, em vez de directamente o genótipo, revelando apenas uma pequena fracção da variação genética numa população (Conner & Hartl 2004).

Ao longo do tempo, foram desenvolvidos diferentes métodos moleculares (e.g. RFLP – *restriction fragment length polymorphism*) para análise directa de variações na sequência de ADN. Estas técnicas consistem essencialmente na conversão da variação genética em fragmentos de ADN de diferentes tamanhos, sendo estes separados num gel por electroforese, em função das diferenças no tamanho dos fragmentos (Conner & Hartl 2004). O advento da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*) proporcionou um crescimento exponencial nos métodos moleculares e nas suas potencialidades (Karp & Edwards 1997). Com esta técnica, tornou-se possível produzir (ou melhor, amplificar) facilmente diversas cópias de fragmentos específicos de ADN a partir de reduzidas quantidades de ADN original (Conner & Hartl 2004).

Apesar dos nomes dos marcadores moleculares variarem bastante conforme a fonte bibliográfica a que se recorre, são aqui apresentados em dois grandes grupos, conforme a especificidade da amplificação: i) a amplificação é feita por intermédio de *primers* especificamente desenhados para o efeito, pelo que requer conhecimento prévio das sequências que flanqueiam (*flanking regions*) a região pretendida; ii) a amplificação ocorre a partir de *primers* arbitrários, mais ou menos universais. No primeiro grupo, incluem-se marcadores como os VNTR (*variable number tandem repeat*) e CAPS (*cleaved amplified polymorphic sequence*), que têm a grande vantagem de serem codominantes; no entanto são mais difíceis de desenvolver para novas espécies uma vez que as sequências específicas dos *primers* para a técnica de PCR têm de ser determinadas (Karp & Edwards 1997, Conner & Hartl 2004). Dentre os VNTR, têm adquirido particular importância na genética ecológica os microsatélites, conforme desenvolvido anteriormente. Apesar da indiscutível utilidade destes marcadores, a técnica *per se* é extremamente onerosa e trabalhosa, já que exige a análise de fragmentos em sequenciador após separação em gel de poliacrilamida (Brede *et al.* 2006, Thielsch *et al.* 2009).

Do segundo grupo de marcadores, destacam-se RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) e AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), que têm a vantagem de se basearem em sequências de *primers* arbitrárias, não sendo por isso necessário identificar *a priori* sequências específicas. Contudo, existe a desvantagem de serem marcadores dominantes e como tal, não ser possível a distinção dos indivíduos heterozigóticos (Billiones *et al.* 2004, Conner & Hartl 2004). A análise por RAPD tem sido uma técnica utilizada em diversos trabalhos com *Daphnia* (Schwenk *et al.* 2001, Picado *et al.* 2007). Nesta técnica, o *primer* irá iniciar a síntese de uma nova cadeia, mesmo quando a ligação com a cadeia de ADN não é perfeita. Cada produto resultante da amplificação vai derivar de uma região do genoma que contenha dois fragmentos curtos que partilham uma sequência similar com o *primer* usado, existentes em cadeias opostas e suficientemente perto para que a amplificação resulte (ver Figura 1). Estes produtos são separados em géis de agarose na presença de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (Karp & Edwards 1997). Para além de representar

um sistema de marcadores dominantes sem informação ao nível da heterozigotia, esta técnica tem também a desvantagem de apresentar limitações metodológicas e teóricas, sendo aconselhada prudência nas inferências acerca da estrutura populacional e divergência nucleotídica baseada em marcadores RAPD (Pérez *et al.* 1998, Billiones *et al.* 2004).

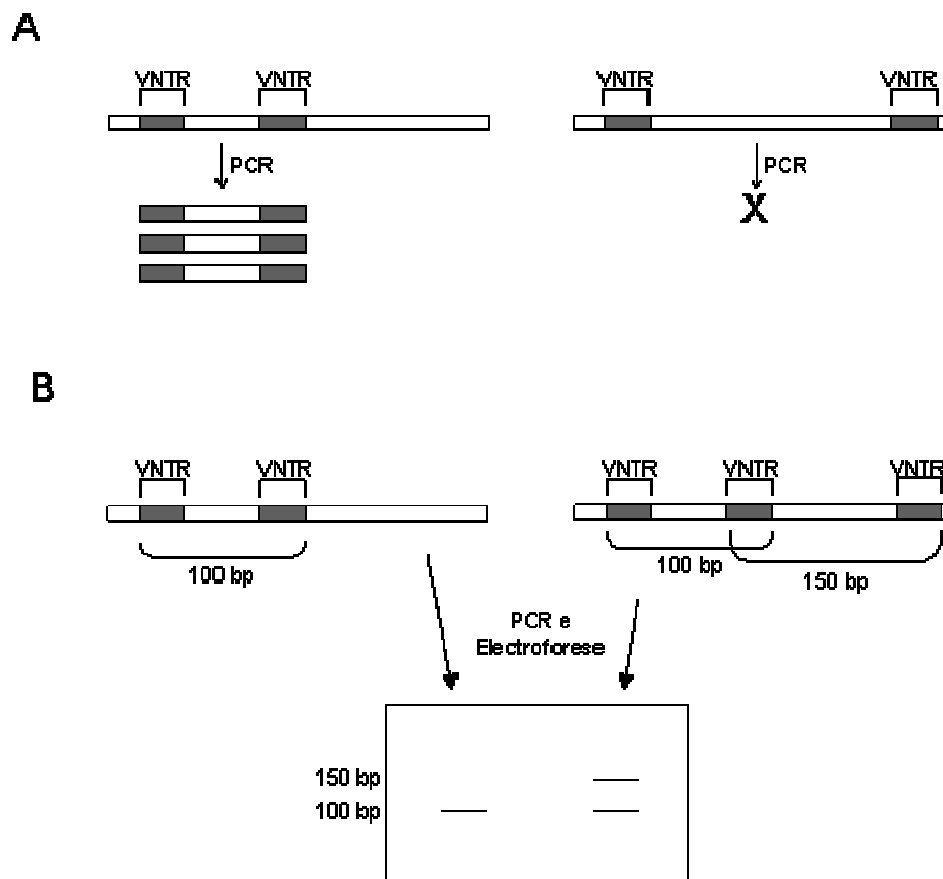


Figura 1. Esquema da amplificação de uma determinada região do genoma por MSP-PCR, que utiliza *primers* arbitrários que se ligam a zonas ubíquas dos genoma (VNTR ou microsatélites). **A.** São produzidas diversas cópias da região desejada quando as VNTR se encontram suficientemente próximas para que a amplificação se realize com sucesso (esquerda); a amplificação não ocorre quando as VNTR se encontram demasiado afastadas (direita). **B.** Produto final de amplificação em dois genótipos hipotéticos, visualizado em gel de agarose.

Uma metodologia análoga a RAPD é a técnica de MSP-PCR (*microsatellite-primed polymerase chain reaction*), ou MS-PCR, ou ISSR (*inter simple sequence repeats*). Esta apresenta-se como uma técnica simples, onde os *primers* utilizados

imitam regiões repetitivas e altamente variáveis do genoma (VNTRs - microsátélites), que são componentes ubíquas de genomas eucarióticos (Cristescu *et al.* 2006). Desta forma, a amplificação gera padrões de bandas individuais únicos, permitindo a distinção de cadeias repetidas de ADN de diferentes indivíduos – *fingerprints* (ver Figura 1) (Alves *et al.* 2007).

Esta técnica não deve ser confundida com aquela utilizada por Thielsch *et al.* (2009), que amplifica a região do microsátélite propriamente dita (conhecendo *a priori* as sequências das regiões que flanqueiam o microsátélite – ver acima); no caso do MSP-PCR, a amplificação decorre na região entre microsátélites (ver Figura 1).

Esta técnica, a qual analisa todo o genoma, tem demonstrado ser relativamente robusta e discriminatória noutros taxa (Hering & Nirenberg 1995, Hantula & Muller 1997, Bornet & Branchard 2001, Alves *et al.* 2007). Czembor (1999) comparou diversas técnicas, tendo mostrado que a técnica descrita seria a mais sensível na detecção de polimorfismos de ADN. Diversos autores observaram uma eficácia significativamente alta de detecção de variabilidade genética desta técnica em outros invertebrados (que não cladóceros), demonstrando as potencialidades do seu emprego na análise da variação entre espécies, populações, e indivíduos (Reddy *et al.* 1999, Abot 2001, Grasela & McIntosh 2003, Schulz *et al.* 2004, Lin *et al.* 2006, Vijayan *et al.* 2006).

Objectivos e estrutura da dissertação

O objectivo desta dissertação consistiu na optimização e aplicação de uma ferramenta molecular, MSP-PCR, em populações de Daphniidae (mormente pertencentes aos géneros *Daphnia* e *Simocephalus*). Esta ferramenta poderá contribuir para ultrapassar a ambiguidade dos critérios morfológicos para a diferenciação de espécies. No âmbito deste trabalho, o interesse nestes marcadores moleculares surgiu sobretudo pelas suas potencialidades na análise de variação genética ao nível sub-específico. Do ponto de vista metodológico, esta técnica apresenta diversas vantagens como o facto de não ser necessário *a priori* conhecer a sequência da região de ADN a amplificar, a abundância de bandas geralmente produzidas usando um único *primer*, o elevado nível de

reprodutibilidade das bandas, e os baixos custos e necessidades técnicas (Grasela & McIntosh 2003).

A optimização da técnica, incluindo a avaliação da sua reprodutibilidade e fiabilidade são apresentados numa secção própria e independente, reportando os resultados obtidos e sua discussão, e constituindo o primeiro capítulo autónomo da presente dissertação. Esta secção, intitulada «Optimização da técnica de MSP-PCR» representa um esforço inicial para minimizar a incerteza associada à ferramenta molecular, e constitui uma componente acessória da dissertação. O segundo capítulo é a componente nuclear da presente dissertação, consistindo na aplicação desta técnica a amostras de laboratório e na análise da sua reprodutibilidade e capacidade na diferenciação genética de indivíduos ao nível sub-específico. Aqui se apresentam os resultados obtidos numa espécie de dafnídeo pouco estudado do ponto de vista molecular (*Simocephalus vetulus*). Intitulado «MSP-PCR como ferramenta de genotipagem em populações de dafnídeos», este capítulo culmina com uma discussão abrangente sobre a utilidade e aplicabilidade dos marcadores moleculares empregues. Os dois capítulos são autónomos, cada um possuindo as suas secções próprias, incluindo lista de referências. Os capítulos são precedidos da presente introdução geral, onde a temática da dissertação é inicialmente abordada e enquadrada, e onde os objectivos são definidos. A secção ulterior da dissertação contempla algumas considerações finais sobre o trabalho realizado e a temática em estudo.

Referências bibliográficas

- Abot P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science* 1.8.: 3 pp
- Alonso M. 1996. *Crustacea, Branchiopoda*: Museo nacional de ciencias naturales Madrid
- Alves A, Phillips A, Henriques I, Correia A. 2007. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112-21
- Behera N, Nanjundiah V. 2004. Phenotypic plasticity can potentiate rapid evolutionary change. *Journal of Theoretical Biology* 226: 177-84
- Benzie JAH. 2005. *Cladocera: The Genus Daphnia (including Daphniopsis)*. Ghent and Leiden: Kenobi Productions & Backhuys. 376 pp.
- Billiones R, Brehm M, Klee J, Schwenk K. 2004. Genetic identification of Hyalodaphnia species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* 526: 43-53
- Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-15
- Brede N, Thielsch A, Sandrock C, Spaak P, Keller B, et al. 2006. Microsatellite markers for European Daphnia. *Molecular Ecology Notes* 6: 536-9
- Castro B. 2007. Ecologia e seleção de habitat em crustáceos zooplânctônicos de lagos pouco profundos. Dissertação de Doutorado. Universidade de Aveiro, Aveiro. 168 pp.
- Cole CJ. 1985. Taxonomy of parthenogenetic species of hybrid origin. *Systematic zoology* 34: 359-63
- Conner J, Hartl D. 2004. *A Primer of Ecological Genetics*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc
- Cristescu M, Colbourne J, Radivojac J, Lynch M. 2006. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics* 88: 415-30

- Czembor P, Arseniuk E. 1999. Study of Genetic Variability Among Monopycnidial and Monopycnidiospore Isolates Derived from Single Pycnidia of *Stagonospora* ssp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR Techniques. *J. Phytopathology* 147: 539-46
- De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica* 23: 121-35
- De Meester L, Louette G, Duvivier c, Damme CV, Michels E. 2007. Genetic composition of resident populations influences establishment success of immigrant species. *Oecologia* 153: 431-40
- De Meester L, Vanoverbeke J, Gelas KD, Ortells R, Spaak P. 2006. Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations - a conceptual framework. *Archiv Fur Hydrobiologie* 167: 217-44
- Duncan A, Little TJ. 2006. Parasite-driven genetic change in a natural population of *Daphnia*. *Evolution* 61: 796-803
- Forró L, Korovchinsky NM, Kotov AA, Petrusek A. 2008. Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 177-84
- Giessler S. 1997. Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 87-105
- Giessler S. 2001. Morphological differentiation within the *Daphnia longispina* group. *Hydrobiologia* 442: 55-66
- Gili M, Monaghan MT, Spaak P. 2004. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals species-specific markers in the *Daphnia galeata-hyalina* species complex. *Hydrobiologia* 526: 63-71
- Gliwicz Z. 1990. Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* 343: 638-40
- Grasela JJ, McIntosh AH. 2003. Application of inter-simple sequence repeats to insect cell lines: identification at the clonal and tissue-specific level. *Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 39: 356-63

- Griffiths A, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. 1999. *Modern Genetic Analysis*. New York: W.H. Freeman and Company
- Hairston NG. 1996. Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography* 41: 1087-92
- Hairston NG, Lampert W, Caceres C. 1999. Rapid evolution revealed by dormant eggs. *Nature* 401: 446
- Hann BJ. 1987. Naturally occurring interspecific hybridization in *Simocephalus* (Cladocera, Daphniidae): Its potential significance. *Hydrobiologia* 145: 219-24
- Hantula J, Muller MM. 1997. Variation within *Gremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS). *Mycol. Res.* 101: 169-75
- Hebert P. 1978. The Population Biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 53: 387-426
- Hembre L, Megard R. 2006. Direct and indirect effects of predation on the genetic structure of a *Daphnia* population. *Journal of Plankton Research* 28: 1129-41
- Hering O, Nirenberg HI. 1995. Differentiation of *Fusarium sambucinum* Fuckel sensu lato and related species by RAPD PCR. *Mycopathologia* 129: 159-64
- Karp A, Edwards KJ. 1997. DNA markers: a global overview. In *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*, ed. G Caetano-Anollés, PM Gresshoff, pp. 1-13. New York: Wiley-Liss
- Keller B, Spaak P. 2004. Nonrandom sexual reproduction and diapausing egg production in a *Daphnia* hybrid species complex. *Limnology and Oceanography* 49: 1393-400
- Keller B, Wolinska J, Tellenbach C, Spaak P. 2007. Reproductive isolation keeps hybridizing *Daphnia* species distinct. *Limnology and Oceanography* 52: 984-91
- Kreutzer C, Lampert W. 1999. Exploitative competition in differently sized *Daphnia* species: a mechanistic explanation. *Ecology* 80: 2348-57
- Lass S, Spaak P. 2003. Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491: 221-39

- Lin H, Hai-yan L, Xiang-Yang Z, Feng Y, Xiang-Dong B, Chong-Bo H. 2006. Population Genetic structure and genetic differentiation of *Artemia parthenogenetica* in China. *HJournal of Shellfish Research* 25: 999-1005
- Lourenço M. 2008. Dinâmica populacional de *Hyalodaphnia* sp. num período de transição ambiental. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro
- Lynch M, Spitze K. 1994. Evolutionary genetics of *Daphnia*. In *Ecological Genetics*, ed. L Real, pp. 109-28. Princeton, NJ: Princeton University Press
- Nadin-Hurley CM, Duncan A. 1976. A comparison of daphnid gut particles with the sestonic particles present in two Thames Valley reservoirs throughout 1970 and 1971. *Freshwater Biology* 6: 109-23
- Pérez T, Albornoz J, Domínguez A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology* 7: 1347-57
- Petrusek A, Hobaek A, Nilssen JP, Skage M, Cerny M, et al. 2008. A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda). *Zoologica Scripta* 37: 507-9
- Picado A, Chankova S, Fernandes A, Simões F, Leverett D, et al. 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 406-10
- Reddy KD, Nagaraju J, Abraham EG. 1999. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. *Heredity* 83: 681-7
- Reid V, Carvalho G, George D. 2000. Molecular genetic analysis of *Daphnia* in the English Lake District: species identity, hybridisation and resting egg banks. *Freshwater Biology* 44: 247-53
- Ringelberg J, Gool Ev, Brehm M. 2004. Density and depth variations of *Daphnia* multilocus genotypes during a summer period in Lake Maarsseven. *Aquatic Ecology* 38: 525-35
- Scheffer M. 1998. *Ecology of shallow lakes*. London: Chapman & Hall
- Schultz RJ. 1969. Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. *American Naturalist* 103: 605-19

- Schulz HK, Smietana P, Schulz R. 2004. Assessment of DNA variations of the noble crayfish (*Astacus astacus* L.) in Germany and Poland using inter-simple sequences repeats (ISSRS). *Bull.Fr.Pêche.Piscic.* 372-373: 387-99
- Schwartz SS, Hebert PDN. 1987. Methods for activation of the resting eggs of *Daphnia*. *Hydrobiologia* 442: 67-73
- Schwenk K, Bijl M, Menken S. 2001. Experimental interspecific hybridization in *Daphnia*. *Hydrobiologia* 442: 67-73
- Schwenk K, Juntilla P, Rautio M, Bastiansen F, Knapp A, et al. 2004. Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (Hyalodaphnia) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnology and Oceanography* 49: 532-9
- Schwenk K, Posada D, Hebert P. 2000. Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 1833-42
- Skage M, Hobæk A, Ruthová S, Keller B, Petrusek A, et al. 2007. Intra-specific rDNA-ITS restriction site variation and an improved protocol to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia* 594: 19-32
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-92
- Spaak P, Hoekstra J. 1995. Life history variation and the co-existence of a *Daphnia* hybrid with its parental species. *Ecology* 76: 553-64
- Thielsch A, Brede N, Petrusek A, Meester Ld, Schwenk K. 2009. Contribution of cyclic parthenogenesis and colonization history to population structure in *Daphnia*. *Molecular Ecology* 18: 1616-28
- Vavrek M, McGraw JB, Bennington CC. 1991. Ecological genetic variation in seed banks. III. Phenotypic and genetic differentiation of plants from young and old subpopulations of *Carex bigelowii*. *Journal of Ecology* 79: 645-62
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, et al. 2006. Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkhorm, *Samia cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6: 11 pp

Capítulo 1

Optimização da técnica de MSP-PCR

Introdução

A inexistência de traços morfológicos estáveis tem sido a principal razão da dificuldade existente na identificação de indivíduos do complexo *Daphnia longispina/galeata/cucullata* (sub-gênero *Hyalodaphnia*). Adicionalmente, sabe-se hoje que a hibridação inter-específica pode ser frequente (Petrusek *et al.* 2008), sendo que os híbridos exibem características morfológicas intermédias relativamente às parentais (Keller & Spaak 2004). Como consequência, tornou-se necessária a utilização de ferramentas moleculares de modo a ser feita uma separação fiável das entidades taxonómicas dentro deste complexo de espécies (Skage *et al.* 2007). Durante algum tempo, a técnica mais utilizada na identificação de espécies *Daphnia* e híbridos foi a electroforese de alozimas ou aloenzimas (Giessler 1997, Keller & Spaak 2004). A necessidade de material fresco ou congelado e a quantidade de material necessário tornam esta técnica desvantajosa quando comparada com técnicas baseadas em PCR (“polymerase chain reaction”): neste último caso, é apenas necessária uma quantidade mínima de ADN e as técnicas podem ser usadas em amostras vivas ou preservadas em álcool, ou em ovos de resistência, facilitando assim a reconstrução de processos ecológicos e evolutivos ao longo do tempo (Schwenk *et al.* 1995, Skage *et al.* 2007). Deste modo, este último tipo de ferramentas moleculares mais recente (incluindo RAPD, PCR-RFLP e análise de microsatélites) tem-se tornado popular no estudo de populações de *Daphnia* (Schwenk *et al.* 1995, Billiones *et al.* 2004, Picado *et al.* 2007).

Neste trabalho, seleccionámos uma técnica simples, denominada MSP-PCR (“microsatellite-primed polymerase chain reaction”), a qual utiliza *primers* arbitrários de modo a distinguir cadeias repetidas de ADN de diferentes indivíduos gerando padrões individuais únicos (*fingerprints*) (Alves *et al.* 2007). Estes *primers* consistem em repetições *tandem* (consecutivas) de 1-5 pares de bases e ligam-se a regiões repetitivas e altamente variáveis do genoma (microsatélites), que são componentes ubíquos de genomas eucarióticos (Cristescu *et al.* 2006, Alves *et al.* 2007). A utilização desta técnica em populações de *Daphnia* está ainda em

aberto, uma vez que requer optimização do número mínimo de marcadores necessários para distinguir indivíduos ou genótipos, assim como necessita ainda afinações na fiabilidade e reprodutibilidade da técnica.

Na optimização de uma técnica baseada em PCR é necessário determinar as condições óptimas de reacção que afectam o seu rendimento, a especificidade e a fidelidade. O rendimento é essencialmente a eficácia do protocolo de PCR, mas por vezes as condições que favorecem uma maior especificidade resultam numa redução do rendimento, sendo por isso necessário encontrar um equilíbrio entre estas duas condições (Mattes 1998). Existem diferentes parâmetros num programa de PCR que podem afectar o rendimento, a especificidade e a fidelidade, como por exemplo a temperatura de *annealing* (temperatura à qual os *primers* se ligam ao material genético a copiar) e a concentração de $MgCl_2$ (Mattes 1998). A temperatura de *annealing* é particularmente importante, pois a utilização de uma temperatura inferior ou superior pode originar produtos de PCR com pesos moleculares diferentes do esperado. Por outro lado, muitos laboratórios observaram que pequenas variações na concentração do ião Mg^{2+} na reacção podem causar grandes efeitos na qualidade e rendimento da amplificação, podendo também afectar a temperatura de *annealing* óptima (Mattes 1998).

Tendo como objectivo desenvolver e optimizar uma ferramenta molecular que permita a discriminação de variação genética nuclear dentro e entre diferentes espécies de *Daphnia*, foi testada a eficácia de vários protocolos laboratoriais na amplificação de ADN pela técnica de MSP-PCR. Foram tidos em conta neste trabalho os dois parâmetros acima referidos, tendo sido testadas diferentes concentrações de $MgCl_2$ e diferentes temperaturas de *annealing* para vários *primers*. Adicionalmente, foram testados três métodos de extracção de ADN, com o objectivo de averiguar se protocolos de extracção de diferente complexidade influenciariam a eficiência da amplificação (PCR).

Material e Métodos

Material Biológico

A colheita de exemplares (*Daphnia*) foi efectuada por arrasto oblíquo na coluna de água com rede de plâncton (malha variável – 55 a 243 μm) em diferentes lagoas e albufeiras: Lamego, Castelo de Bode, Tapada Grande, Lagoa da Vela, Santa Clara, Maranhão, Azibo, Alqueva, Aguieira e Lagoa de Mira (Figura 2). Estas amostras foram preservadas em álcool a $\approx 80\%$ e armazenadas a 4°C , para posterior análise molecular. Os exemplares das diferentes populações foram utilizados de forma aleatória, independentemente da experiência: não era pretendido fazer inferências acerca das populações, na medida em que serviram apenas como fonte de amostras aleatórias de diferentes genótipos.



Figura 2. Localização dos diferentes locais amostrados para este trabalho: Az – Azibo, L – Lamego, Ag – Aguieira, Mi – Lagoa de Mira, V – Lagoa da Vela, CB – Castelo de Bode, Ma – Maranhão, Al – Alqueva, TG – Tapada Grande, SC – Santa Clara.

Em laboratório, algumas fêmeas ovígeras foram isoladas e transferidas para microtubos com etanol a $\approx 80\%$ e armazenadas a 4°C . A extracção do material genético de cada indivíduo foi feita isoladamente, com cada exemplar a ser processado individualmente. Isto pode criar dificuldades do ponto de vista metodológico, uma vez que a extracção de ADN a partir de um só indivíduo de pequenas dimensões pode originar material genético insuficiente para as análises

a realizar, resultando em elevadas taxas de insucesso do método de PCR. Daqui resulta a necessidade de otimizar e testar diferentes variações do protocolo de isolamento e amplificação de ADN (ver abaixo).

Extracção de ADN

O método utilizado para a extracção de ADN foi descrito por Schwenk *et al.* (1998), tendo sofrido pequenas adaptações ao longo do tempo (ver Schwenk *et al.* (2004) e Brede *et al.* (2006)). A escolha deste método deve-se ao facto de a sua eficiência na extracção de material genético de *Daphnia* ter sido comprovada noutros trabalhos (Lourenço 2008). As amostras preservadas em etanol foram transferidas para uma solução de lavagem [500 µl de tampão TE: 10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8,0 a 25°C] e incubadas durante, pelo menos, 2h. Este procedimento tem como objectivo a remoção do excesso de etanol das amostras, o qual poderia comprometer a extracção de ADN. Após a incubação, cada indivíduo foi transferido para um tubo de reacção contendo 72 µl de uma mistura de tampão H3 [100 mM Tris (pH 8,3 a 25 °C) + 0,5 M KCl + 0,05% Tween 20® + 0,05% NP-40 (Tergitol®)] e 20 µg de Proteinase K, sendo esta protease utilizada para inactivar as nucleases presentes nas amostras, de modo a proteger o ADN. Para maximizar a extracção, as amostras foram incubadas a 40°C num banho de água durante, pelo menos, 6 h, tendo sido posteriormente feita uma centrifugação a 14 000 rpm durante uns segundos. Para desactivar a Proteinase K, as amostras foram sujeitas a um aquecimento a 90°C durante 12 min. Após uma segunda centrifugação rápida a 14 000 rpm as amostras foram armazenadas a 4°C ou congeladas (conforme a rapidez das análises subsequentes) de modo a manter a integridade do ADN.

Com o objectivo de averiguar se diferentes protocolos de extracção influenciariam a eficácia da amplificação de ADN, este método-base foi posteriormente comparado com outros protocolos de isolamento (ver Experiência 2).

Amplificação e visualização de ADN

Cada reacção de MSP-PCR (24 µl) era constituída por: MgCl₂ (0,75-3,0 mM – ver optimização da concentração utilizada na Experiência 1), 1X Tampão de

PCR, 0,2 mM de dNTP, 0,3 μ M de *primer* e 1 unidade de *Taq* ADN polimerase (Go *Taq* Flexi DNA polymerase, PROMEGA). Os parâmetros do termociclador utilizados para a amplificação foram: um período inicial de desnaturação a 95°C durante 120 s; 35 ciclos de 94°C por 45 s, 45-60°C por 45 s (a temperatura de *annealing* foi ajustada conforme o *primer* utilizado em cada amplificação – ver Experiência 1) e 72°C durante 90 s; a amplificação foi terminada com um passo de extensão final a 72°C durante 10 min.

Os produtos de PCR foram visualizados num gel de agarose a 2%, após separação por electroforese (80 V) e imersão do gel em brometo de etídio (o qual se liga especificamente ao ADN e é visível sob luz UV). Foi utilizado um marcador de peso molecular comercial de 100 bp (100-1500 bp), seguindo as indicações do fabricante (Vivantis). As imagens (fotografias dos géis) foram capturadas e digitalizadas com um aparelho de aquisição de imagem G:BOX HR (SynGene, USA), usando o software GeneSnap (SynGene®, USA).

EXPERIÊNCIA 1: Optimização das condições de PCR

Primeiramente, foi testado o efeito da concentração de $MgCl_2$ sobre o rendimento da amplificação, utilizando o material isolado de quatro espécimes de populações distintas, empregando os *primers* (GTGC)₄ e (GACA)₄ (usando uma temperatura de *annealing* pré-definida de 50°C). Foram realizados dois ensaios: o primeiro compreendia uma gama alta de concentrações de $MgCl_2$ (3,0 mM, 2,5 mM, 2,0 mM e 1,5 mM) ao passo que o segundo utilizou uma gama baixa de concentrações (2,0 mM, 1,5 mM, 1,0 mM e 0,75 mM). As concentrações dos restantes reagentes utilizados nas amplificações de ADN foram as descritas acima.

Foram também realizadas amplificações com gradiente de temperatura entre 60°C e 45°C (temperaturas intermédias: 58,9°C; 57,0°C; 54,1°C; 50,0°C; 47,9°C; 46,0°C) para diversos *primers*. Adicionalmente, realizaram-se ensaios com os *primers* (GTGC)₄, (GACA)₄ e M13, com o objectivo de determinar a temperatura óptima de *annealing* entre duas temperaturas utilizadas (45°C e 50°C). A concentração de $MgCl_2$ usada neste conjunto de experiências foi de 2,0 mM (em

função dos resultados dos ensaios anteriores) e as concentrações dos demais reagentes utilizados no protocolo de PCR foram as descritas acima.

EXPERIÊNCIA 2: Comparação de protocolos de extracção de ADN

O método doravante designado por A, consistiu em transferir 4 indivíduos de *Daphnia* da Lagoa da Vela e 4 indivíduos da Lagoa de Mira para tubos de reacção contendo 250 µl de tampão TES [0,2 M Tris-HCl (pH 8,0) + 10 mM EDTA (pH 8,0) + 0,5 M NaCl + 1% SDS]. De seguida, as amostras foram fervidas a 100°C durante 3 minutos e posteriormente colocadas 10 min em gelo. A cada amostra foi adicionado 100 µg de Proteinase K, com posterior incubação a 65°C durante 30 min. Com o objectivo de aumentar a concentração salina (de modo a permitir uma precipitação de ADN mais eficaz), adicionou-se 70 µl de NaCl 5M e 32,5 µl de CTAB 10% (brometo de cetil-trimetilamónio). Após segunda incubação a 65°C durante 30 min, adicionou-se 500 µl de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1), e misturou-se suavemente por inversão durante 1 min, levando à desnaturação de proteínas. Seguiu-se de uma incubação em gelo durante 30 min. As amostras foram centrifugadas durante 10 min, a 12 000 rpm e 4°C, sendo depois transferido o sobrenadante para um novo tubo de reacção. Adicionou-se 112,5 µl de acetato de amónio (NH₄OAc ou CH₃COONH₄) 5M (para remoção das proteínas) ao sobrenadante, misturou-se suavemente e após uma incubação em gelo durante 30 min centrifugou-se a 12 000 rpm e 4°C, durante 10 min. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de reacção, adicionou-se 0,55 volumes (neste caso cerca de 250 µl) de isopropanol frio (-20°C) e misturou-se suavemente, levando à precipitação de ADN uma vez que este é insolúvel neste álcool. Após incubação em gelo durante 30 min, as amostras foram centrifugadas durante 10 min, a 12 000 rpm e 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet resultante lavado com etanol a 70%. As amostras foram centrifugadas a 12 000 rpm a 4°C, durante 10 min, e após o pellet secar à temperatura ambiente, foi dissolvido em 72 µl de tampão TE [10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8,0 a 25°C] e armazenado a 4°C. Esta é uma metodologia clássica de isolamento e purificação de ADN (Möller *et al.* 1992), tendo como desvantagem os vários passos do protocolo e a utilização de reagentes nocivos.

O segundo método de extracção, doravante designado por B, foi o método escolhido inicialmente para este trabalho, e que se descreveu acima. É um protocolo com menos passos laboratoriais, ideal para o processamento de múltiplas amostras, tendo sido adaptado de uma técnica de extracção de ADN para células sanguíneas (Kawasaki 1990).

O método C seguiu um procedimento idêntico ao protocolo B, com a introdução de um passo de maceração prévia de cada organismo no tampão de extracção (H3 + Proteinase K), utilizando uma pinça esterilizada. De forma a minimizar contaminações entre espécimes, a pinça foi mergulhada em álcool e queimada à chama entre cada maceração.

Resultados e Discussão

Concentração de $MgCl_2$ no protocolo de amplificação

A análise dos padrões de bandas, amplificadas com concentrações de $MgCl_2$ variando entre 0,75 mM e 3,0 mM, demonstrou que a amplificação de ADN é mais eficaz quando a concentração de $MgCl_2$ utilizada está entre 1,5-2,0 mM (Figuras 3 e 4). Abaixo de 1,5 mM, a amplificação revelou ser notoriamente insatisfatória (Figura 4), ao passo que, acima de 2,0 mM, as bandas eram visualizadas com algum grau de indefinição (vulgo “smear” - Figura 3), possivelmente resultante de amplificação inespecífica (excesso de $MgCl_2$). Decidiu-se utilizar nas posteriores amplificações a concentração de $MgCl_2$ de 2,0 mM, uma vez que o íão Mg^{2+} é necessário para a estabilidade e funcionamento da *Taq* DNA polimerase e a concentração de 1,5 mM pode não ser suficiente para uma amplificação bem sucedida (ver perfil de bandas para o primer $(GACA)_4$ - Figura 4) comprometendo assim a qualidade dos produtos de PCR e, consequentemente, a capacidade de resolução da técnica.

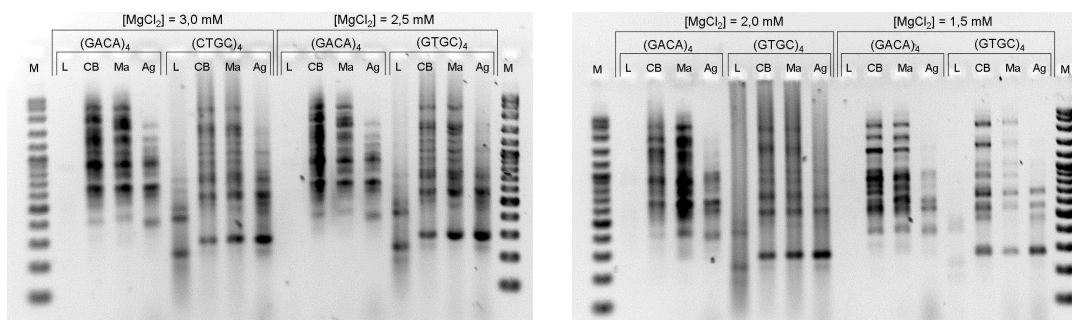


Figura 3. Padrão de bandas amplificadas com os *primers* $(GACA)_4$ e $(GTGC)_4$, utilizando quatro concentrações de $MgCl_2$: 3,0 mM, 2,5 mM, 2,0 mM e 1,5 mM. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de um marcador de peso molecular comercial (100 bp) – 1500-100 bp (M). Cada combinação entre *primer* e concentração de $MgCl_2$ utilizou os mesmos quatro indivíduos de populações distintas de *Daphnia* (L - Lamego; CB - Castelo de Bode; Ma – Maranhão; Ag - Aguieira).

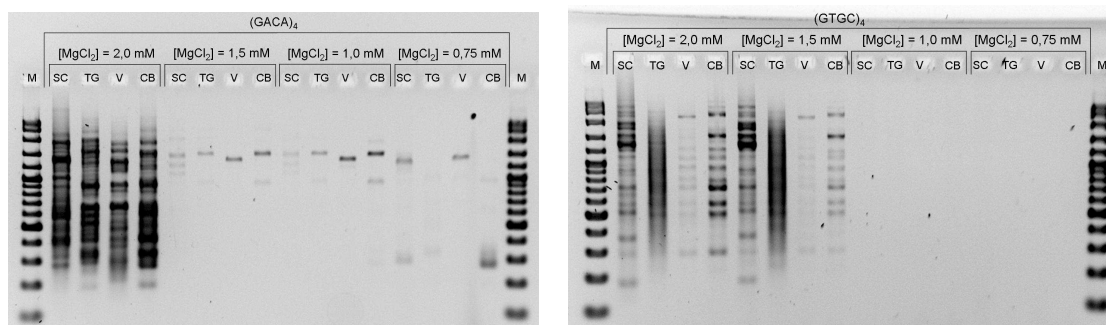


Figura 4. Padrão de bandas amplificadas com os *primers* (GACA)₄ e (GTGC)₄, utilizando quatro concentrações de MgCl₂: 2,0 mM, 1,5 mM, 1,0 mM e 0,75 mM. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de um marcador de peso molecular comercial (100 bp) – 1500-100 bp (M). Cada combinação entre *primer* e concentração de MgCl₂ utilizou os mesmos quatro indivíduos de populações distintas de *Daphnia* (SC – Santa Clara; TG – Tapada Grande; V – Lagoa da Vela; CB – Castelo de Bode).

Temperatura de *annealing* no protocolo de amplificação

Embora seja possível calcular matematicamente a temperatura de *annealing* óptima para cada *primer*, os testes com gradiente de temperatura revelam ser uma ferramenta importante. A título de exemplo, apresentamos os padrões de bandas amplificadas com os *primers* (ACC)₆ e (CAA)₇, num ensaio com gradiente de temperatura. Através do cálculo $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ (Nitsche 2007), a temperatura de *annealing* dos *primers* (ACC)₆ e (CAA)₇ seria 60°C e 56°C, respectivamente. É possível observar que, no caso das amplificações realizadas com os *primers* referidos, o padrão de bandas mais distinto corresponde ao ADN amplificado entre 57-60°C (Figura 5), tendo sido considerado 57°C como a temperatura de *annealing* óptima para estes *primers* nas posteriores análises. A escolha de uma mesma temperatura para mais que um *primer* é um pormenor importante do ponto de vista logístico, já que permite utilizar o mesmo programa do termociclador para mais que um marcador.

É igualmente possível ver a importância que a utilização de uma temperatura de *annealing* correcta tem numa amplificação de ADN através dos testes efectuados com duas temperaturas. Aqui apresentamos, como exemplo, os padrões de bandas amplificadas com o *primer* (GTGC)₄, onde podemos observar que a eficácia desta amplificação (e consequente definição dos bandas no gel de

agarose) é maior quando a temperatura de *annealing* usada é 50°C, e não 45°C (Figura 6).

Foram realizados testes com diferentes temperaturas de *annealing* para cada *primer* usado neste trabalho, de modo a determinar a temperatura óptima de *annealing* de cada um.

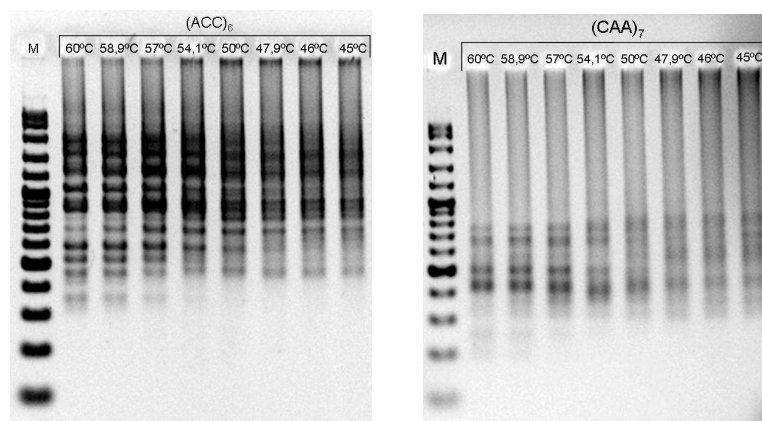


Figura 5. Padrão de bandas amplificadas com os *primers* (ACC)₆ e (CAA)₇, com um gradiente de temperatura de 60°C a 45°C. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de um marcador de peso molecular comercial (100 bp) – 1500-100 bp (M). Cada poço de gel representa o mesmo indivíduo de uma população de *Daphnia* da Tapada Grande para as amostras amplificadas com o *primer* (ACC)₆, e da Albufeira de Lamego para amostras amplificadas com o *primer* (CAA)₇.

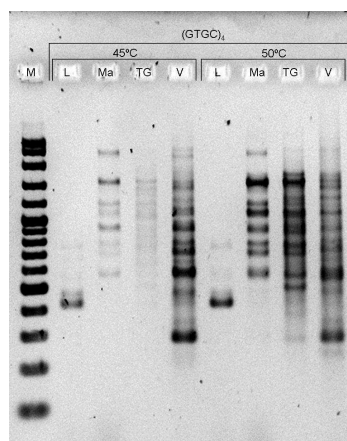


Figura 6. Padrão de bandas amplificadas com o *primer* (GTGC)₄, a 45°C e 50°C. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de um marcador de peso molecular comercial (100 bp) – 1500-100 bp (M). Cada combinação entre o *primer* e temperatura de *annealing* utilizou os mesmos quatro indivíduos de populações distintas de *Daphnia* (L – Lamego, Ma – Maranhão, TG – Tapada Grande, V – Lagoa da Vela).

Extracção de ADN

A análise dos padrões de bandas presentes no gel de agarose demonstra que não há diferenças relevantes no resultado obtido em cada tipo de extracção (Figura 7). A não-amplificação de algumas amostras com o *primer* (GTGC)₄ pode dever-se a razões externas ao método de extracção, tal como a qualidade de ADN das amostras ou uma falha durante o protocolo de PCR. Qualquer um dos métodos está sujeito a amplificações mal conseguidas resultante de factores aleatórios.

Utilizando o método A obtivemos resultados satisfatórios na amplificação de ADN com o *primer* (GACA)₄ contudo este método é mais moroso e é necessária a utilização de um maior número de reagentes, tornando-o mais dispendioso e submetendo o investigador a reagentes químicos desnecessários. Os métodos B e C revelaram ser também protocolos eficazes de extracção de ADN, na amplificação com ambos os *primers* (Figura 7).

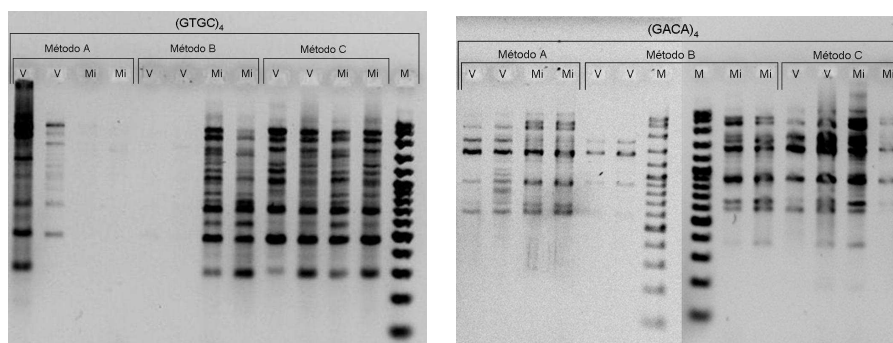


Figura 7. Padrão de bandas amplificadas com os *primers* (GTGC)₄ e (GACA)₄. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado o padrão de um marcador de peso molecular comercial (100 bp) – 1500-100 bp (M). Cada poço do gel representa um indivíduo distinto de duas populações de *Daphnia* (V – Lagoa da Vela, Mi – Lagoa de Mira).

Dado que a sua eficiência é comparável à do protocolo A, parece razoável optar por estes protocolos em futuros isolamentos dado a sua simplicidade. O facto de, no método C, a amostra ser macerada no tampão de lavagem pode aumentar a quantidade de ADN libertado, permitindo assim uma maior quantidade final de ADN e diminuindo o risco de obter material genético insuficiente, possível

em extracções de ADN de indivíduos de pequenas dimensões. No entanto, este procedimento aumenta o risco de contaminações entre amostras e torna o trabalho mais moroso e menos praticável quando houver um elevado número de amostras a processar. A rapidez e simplicidade do método B, que havia já sido bem-sucedido na amplificação do fragmento ITS em *Daphnia* num trabalho anterior (Lourenço 2008), tornam-no num método de eleição para extracção do ADN total de dafnídeos.

Referências bibliográficas

- Alves A, Phillips A, Henriques I, Correia A. 2007. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112-21
- Billiones R, Brehm M, Klee J, Schwenk K. 2004. Genetic identification of Hyalodaphnia species and interspecific hybrids. *Hydrobiologia* 526: 43-53
- Brede N, Thielsch A, Sandrock C, Spaak P, Keller B, et al. 2006. Microsatellite markers for European Daphnia. *Molecular Ecology Notes* 6: 536-9
- Cristescu M, Colbourne J, Radivojac J, Lynch M. 2006. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics* 88: 415-30
- Giessler S. 1997. Analysis of reticulate relationships within the *Daphnia longispina* species complex. Allozyme phenotype and morphology. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 87-105
- Kawasaki E. 1990. Sample preparation from blood, cells, and other fluids. In *PCR protocols: a guide to methods and applications.*, ed. M Innis, D Gelfand, pp. 146-52. San Diego, CA: Academic Press
- Keller B, Spaak P. 2004. Nonrandom sexual reproduction and diapausing egg production in a *Daphnia* hybrid species complex. *Limnology and Oceanography* 49: 1393-400
- Lourenço M. 2008. Dinâmica populacional de *Hyalodaphnia* sp. num período de transição ambiental. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro
- Mattes WB. 1998. The Basics of the Polymerase Chain Reaction. In *PCR Protocols in Molecular Toxicology*, ed. JPV Heuvel, pp. 1-39. Boca Raton, FL: CRC Press
- Möller E, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucl Acids Res* 22: 6115-6

- Nitsche. 2007. Oligonucleotide Design for In-House Real-Time PCR In *Real-time PCR in Microbiology - From Diagnosis to Characterization*, ed. I Mackay, pp. 46-8. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Petrusek A, Seda J, Machacek J, Ruthova S, Smilauer P. 2008. *Daphnia* hybridization along ecological gradients in plagic environments: the potencial for the presence of hybrid zones in plankton. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 2931-41
- Picado A, Chankova S, Fernandes A, Simões F, Leverett D, et al. 2007. Genetic variability in *Daphnia magna* and ecotoxicological evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 406-10
- Schwenk K, Ender A, Streit B. 1995. What can molecular markers tell us about the evolutionary history of *Daphnia* species complexes? *Hydrobiologia* 307: 1-7
- Schwenk K, Juntilla P, Rautio M, Bastiansen F, Knapp A, et al. 2004. Ecological, morphological, and genetic differentiation of *Daphnia* (Hyalodaphnia) from the Finnish and Russian subarctic. *Limnology and Oceanography* 49: 532-9
- Schwenk K, Sand A, Boersma M, Brehm M, Mader E, et al. 1998. Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquatic Ecology* 32: 37-51
- Skage M, Hobæk A, Ruthová S, Keller B, Petrusek A, et al. 2007. Intra-specific rDNA-ITS restriction site variation and an improved protocol to distinguish species and hybrids in the *Daphnia longispina* complex. *Hydrobiologia* 594: 19-32

Capítulo 2

MSP-PCR como ferramenta de genotipagem em populações de dafnídeos

Introdução

Em estudos populacionais, a aplicação de técnicas de *fingerprinting* ou genotipagem adquire especial importância em duas situações complementares: i) na análise da estrutura populacional, em amostras de campo; ii) na diferenciação de linhagens de organismos mantidos em laboratório. Em populações naturais (amostras de campo), estes marcadores moleculares possibilitam o estudo da dinâmica e estrutura populacional, permitindo analisar a variabilidade genética intra- e inter-populacional, pontualmente ou ao longo do tempo, entre outras aplicações (Schierwater *et al.* 1997, Riltand & Ritland 2000, Scribner & Pearce 2000, Balloux & Lugon-Moulin 2002). Por sua vez, a aplicação destas técnicas em indivíduos cultivados em laboratório permite confirmar a sua identidade, quer em cultura, quer no decurso da realização de experiências. Especificamente, no caso de espécies onde é possível manter linhas clonais descendentes das progenitoras originais (por reprodução assexuada), o uso de ferramentas moleculares pode permitir a distinção de clones em animais experimentais (Brede *et al.* 2006, Seidendorf *et al.* 2007).

Segundo Conner e Hartl (2004), os microsátélites e os AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) representam os marcadores moleculares mais adequados para estudos populacionais. A variação na estrutura dos microsátélites (regiões do genoma altamente variáveis, constituídas por repetições de cadeias curtas de nucleótidos) é hoje encarada como o método com maior grau de resolução, dado que exhibe codominância (o que permite obter frequências alélicas com exactidão) e apresenta muitos alelos por *locus* na mesma população (Scribner & Pearce 2000, Conner & Hartl 2004). Contudo, esta técnica requer conhecimento prévio das sequências que flanqueiam a região hiper-variável (microsatélite). Os AFLP são uma técnica alternativa, baseada em *primers* de natureza arbitrária (Schierwater *et al.* 1997, Conner & Hartl 2004), mas proporcionam geralmente perfis de natureza dominante, o que levanta algumas dificuldades na obtenção de frequências alélicas (Riltand & Ritland 2000).

Contudo, o elevado custo e a complexidade da análise de microsatélites e AFLP torna oneroso o uso rotineiro destes marcadores em estudos populacionais. Deste modo, outros marcadores perfilam-se como potenciais ferramentas de *fingerprinting* genético, tais como os utilizados na técnica de MSP-PCR (*microsatellite-primed polymerase chain reaction*) ou ISSR (*inter simple sequence repeats*). Esta técnica aproveita igualmente a ubiquidade dos microsatélites, não como região a amplificar, mas como base para a criação de *primers* arbitrários. Estes ligam-se às regiões homólogas do ADN da amostra, possibilitando a amplificação da região entre os microsatélites (Zietkiewicz *et al.* 1994, Weising *et al.* 1995, Bornet & Branchard 2001). Esta técnica demonstrou já um elevado grau de variabilidade (polimorfismos) e grande utilidade em estudos de sistemática e diferenciação de estirpes e raças dentro da mesma espécie (Hantula & Muller 1997, De León & Jones 2004, Alves *et al.* 2007), ou mesmo linhagens celulares de um mesmo indivíduo (Grasela & McIntosh 2003). Esta técnica é análoga a uma outra técnica popular – RAPD, *random amplified polymorphic DNA* (Lynch & Milligan 1994, Riltand & Ritland 2000). À semelhança de RAPD, a fiabilidade da técnica de MSP-PCR apresenta alguma susceptibilidade a ligeiras alterações nas condições de reacção, como a concentração de *primer* e $MgCl_2$, e a temperatura de *annealing* (Weising *et al.* 1995).

Uma limitação da utilização destes marcadores em estudos de genética populacional é o facto de serem marcadores dominantes, dificultando o cálculo das frequências alélicas e genotípicas, que constituem pedra basilar para o cálculo de estatísticas genéticas (Conner & Hartl 2004, Culley 2005). Utilizando marcadores dominantes, a presença ou ausência de uma banda pode considerar-se tanto um caso de homozigotia dominante como de heterozigotia. Mais, o equilíbrio de Hardy-Weinberg¹ não pode ser medido directamente, mas tem de ser assumido à partida para ser possível determinar as frequências alélicas e consequentes medidas de distância genética (Lynch & Milligan 1994). A técnica tradicional para a determinação das frequências alélicas assume a ausência de bandas como perfil de um genótipo homozigótico (dominante ou recessivo) para

¹ Lei básica utilizada na genética populacional, que postula constância nas frequências alélicas ao longo das gerações na ausência de migrações, mutações, isolamento de outras populações, e selecção natural, assumindo cruzamentos sexuais aleatórios.

um *locus* hipotético (Conner & Hartl 2004). Contudo, a ausência de bandas pode ser causada por factores intrínsecos à técnica (ver Culley 2005). Consequentemente, a ausência de bandas partilhada entre indivíduos pode sobrestimar o parentesco entre estes, devendo ser utilizada com precaução em análises populacionais. Uma forma de abordar este problema é a utilização de métodos de análise que dêem enfoque à presença de bandas (fragmentos de ADN amplificados), como os coeficientes de similaridade de Jaccard e de Dice, que comparam o número de bandas partilhadas presentes entre indivíduos ou populações (Culley 2005). O uso destes coeficientes não requer qualquer assunção prévia de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Culley 2005).

Tendo presentes as vantagens e limitações do uso de marcadores moleculares dominantes, aplicámos a técnica de MSP-PCR em populações de um invertebrado planctónico, *Simocephalus vetulus* (Cladocera, Daphniidae). Como é característico dos cladóceros, este organismo dulçaquícola reproduz-se por intermédio de partenogénese cíclica, alternada por episódios de reprodução assexuada e períodos de diapausa (Alonso 1996). Tais características tornam estes crustáceos um objecto de estudo particularmente interessante do ponto de vista da genética populacional (ver Introdução Geral). Este trabalho foi realizado com o objectivo de testar a utilidade da técnica de MSP-PCR como ferramenta de análise da variabilidade intra- e inter-populacional, através da sua aplicação a diferentes populações de *S. vetulus*. Numa primeira etapa, foi avaliada a variabilidade intrínseca do MSP-PCR (desde a extracção de DNA até à amplificação) e as interferências dessa mesma variabilidade no grau de resolução e reprodutibilidade da técnica. Posteriormente, foi aplicada a técnica de MSP-PCR (usando 3 *primers* seleccionados, por serem os mais informativos) a 3 populações distintas de *S. vetulus*, com o objectivo de reconstruir a sua estrutura genética. Esta segunda etapa pretendia avaliar as potencialidades desta técnica, quer na análise da estrutura populacional de amostras de campo, quer na diferenciação de linhagens clonais de dafnídeos mantidas em laboratório.

Material e Métodos

Material biológico

A colheita de exemplares (*Simocephalus vetulus*) foi efectuada por arrasto oblíquo na coluna de água com rede de plâncton (malha variável – 55 a 243 μm) em três locais diferentes: Lagoa de Melides (M), Lagoa de Mira (LM) e numa vala que comunica com a Lagoa de Mira (Vala de Mira - VM) (Figura 8).



Figura 8. Localização dos diferentes locais amostrados para este trabalho: LM – Lagoa de Mira, VM – vala de Mira, M – Lagoa de Melides.

Estes 3 locais representam 3 populações distintas e, à partida, geneticamente isoladas, apesar de não ser possível descartar algum grau de conectividade entre LM e VM. No laboratório, procedemos ao isolamento de fêmeas ovígeras (contendo ovos assexuados), que foram individualizadas em frascos de vidro contendo 100 ml de meio de cultura (água reconstituída, moderadamente dura – ver abaixo). Aquando da libertação dos juvenis pela fêmea, foi dado início a culturas de grupo contendo esses juvenis fundadores (já nascidos em laboratório). A descendência de cada fêmea original foi manipulada como se tratasse de uma linhagem clonal independente (à qual foi dado um código único, consoante o local de origem – ex.: LM1, LM2, VM1, VM2, M1, M2, ...), evitando qualquer mistura de indivíduos de diferentes linhagens no mesmo

frasco. Uma vez estabelecida a cultura de grupo fundadora (geração 0), as fêmeas originais foram então descartadas. Foi permitido a esta geração reproduzir-se assexuadamente, garantindo a renovação cíclica da geração ao atingir a 3ª ninhada. Estas linhagens clonais são objecto de estudo de uma tese de doutoramento em curso. As culturas dos diversos clones foram mantidas em laboratório segundo condições padronizadas, que abaixo se descrevem.

Para a manutenção das culturas foi usado um meio de cultura sintético, designado de água reconstituída moderadamente dura (EPA 2002), preparado com água nanopura, NaHCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl, e $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Foi ainda adicionado um suplemento vitamínico (tiamina HCl, cianocobalamina e biotina), seguindo a receita de Elendt e Bias (1990). O alimento utilizado na dieta dos indivíduos foi a alga verde *Selenastrum capricornutum*, cultivada em sistema de crescimento contínuo em laboratório (ver Antunes 2001). Foi igualmente adicionado ao meio de cultura um aditivo orgânico constituído por um extracto da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Baird *et al.* 1989, ver Antunes 2001). A renovação do meio de cultura foi feita de 2 em 2 dias, através da transferência dos organismos para recipientes contendo meio de cultura, alimento e extracto frescos. As culturas foram armazenadas em câmaras climáticas com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de 16 h^{Luz}:8 h^{Escuro}.

Extracção e amplificação de ADN

O método utilizado para a extracção de ADN foi descrito no primeiro capítulo da presente dissertação. Devido ao reduzido tamanho dos indivíduos e ao número utilizado, optou-se pelo método anteriormente designado por C: protocolo de extracção descrito por Schwenk *et al.* (1998) (o qual sofreu pequenas alterações ao longo do tempo: ver Schwenk *et al.* 2000, Brede *et al.* 2006), com introdução de um passo de maceração prévia de cada organismo. Os *primers* arbitrários (GTG)₅, (CAG)₆, (ACC)₆, e (GACA)₄ foram usados para gerar padrões de amplificação com capacidade de discriminar ao nível do genótipo (em teoria). Os parâmetros da reacção de PCR utilizados foram: um período inicial de desnaturação a 95°C durante 120 s; 35 ciclos de 94°C por 45 s, $50\text{-}57^\circ\text{C}$ por 45 s (a temperatura de *annealing* foi ajustada conforme o *primer* utilizado em cada

amplificação – ver Tabela 1) e 72°C durante 90 s; a amplificação foi terminada com um passo de extensão final a 72°C durante 10 min.

Tabela 1. Temperatura de *annealing* de cada *primer* utilizado.

<i>Primers</i>	Temperatura de <i>annealing</i>
(GTG) ₅	50°C
(CAG) ₆	57°C
(ACC) ₆	57°C
(GACA) ₄	50°C

Os produtos de PCR foram armazenados a -20°C, de modo a manter a integridade do ADN. A sua separação foi efectuada por electroforese com gel de agarose (1,5%), uniformizando as condições de corrida (90 V durante 4 h); os fragmentos de ADN amplificado foram visualizados sob luz ultravioleta, após imersão do gel num banho de brometo de etídio.

EXPERIÊNCIA 1: Reprodutibilidade da técnica de MSP-PCR

Foi realizada a extracção de ADN em 9 indivíduos da população da Lagoa de Melides (M), abrangendo 3 linhagens clonais putativas (M13, M51 e M67). Deste modo, cada linhagem clonal era representada por 3 organismos diferentes (mas geneticamente iguais). Para cada organismo, foram realizadas 2 amplificações (usando reagentes diferentes) com cada um dos *primers* acima indicados. Deste modo, foi possível avaliar a reprodutibilidade da técnica entre diferentes amplificações de ADN dos mesmos indivíduos, assim como entre amplificações de indivíduos diferentes com o mesmo genótipo (clones). Esta experiência pretendia estabelecer as bases para futuras aplicações da técnica de MSP-PCR enquanto ferramenta de genotipagem, permitindo avaliar o nível de variabilidade intrínseco da técnica propriamente dita.

A análise da variabilidade genética entre indivíduos realizou-se através da comparação dos padrões de bandas obtidos. Estes padrões foram convertidos numa matriz binária bidimensional (1 = presença de banda; 0 = ausência de banda). A partir desta matriz inicial, foram construídas matrizes de similaridade

utilizando o coeficiente de Jaccard² (Culley 2005), o que possibilitou a aplicação de uma análise de classificação (*clustering*) donde resultaram dendrogramas que reflectem a arquitectura genética das populações amostradas. Os dendrogramas foram construídos utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). Todas as análises foram realizadas por computador através do programa GelCompar II (Applied Maths).

EXPERIÊNCIA 2: Arquitectura genética de populações de laboratório

Foi realizada a extracção de ADN a 18 indivíduos (de 18 linhagens clonais putativas) de cada uma das populações (M, LM e VM), de modo a testar a aplicabilidade da técnica e a sua capacidade para reconstruir a arquitectura genética inter- e intra-populações. Para cada marcador molecular (*primer*), foram realizadas 2 amplificações (usando reagentes diferentes) para cada indivíduo, com o intuito de minimizar a incerteza no poder discriminatório desta ferramenta. Nesta experiência, foram apenas utilizados os *primers* (GTG)₅, (CAG)₆ e (ACC)₆, na medida em que o *primer* (GACA)₄ revelou ser pouco informativo para esta espécie de dafnídeo (ver resultados para a Experiência 1) e tivemos insucesso nas amplificações de várias amostras com este *primer*. A análise da variabilidade genética entre indivíduos realizou-se da mesma forma que a descrita na Experiência 1.

² Coeficiente de Jaccard: $a/(a+b+c)$, em que “a” corresponde ao número de bandas presentes comuns a ambos os indivíduos (X e Y), “b” corresponde ao número de bandas exclusivas do indivíduo Y e “c” ao número de bandas exclusivas do indivíduo X.

Resultados

EXPERIÊNCIA 1: Reprodutibilidade da técnica de MSP-PCR

As amplificações de ADN de cada indivíduo da espécie *Simocephalus vetulus* da Lagoa de Melides (M), realizadas em duplicado com diferentes reagentes (aqui referidas como PCR 1 e PCR 2), revelaram padrões de *fingerprinting* complexos. Após separação por electroforese dos fragmentos amplificados com os *primers* (ACC)₆, (CAG)₆, (GTG)₅ e (GACA)₄, surgiram bandas entre os 400 bp e os 1500 bp (Figura 9). Analisando os padrões de bandas obtidos na primeira e segunda amplificação (PCR 1 e PCR 2), é possível observar que determinadas bandas não são reprodutíveis entre amplificações. Por exemplo, os fragmentos com ≈ 700 bp do genótipo M51, amplificados com o *primer* (GACA)₄, surgem apenas na primeira amplificação (PCR 1), não sendo perceptíveis na segunda amplificação (PCR 2) (indicado com uma seta, Figura 9). Uma observação atenta permitirá detectar outros casos. Isto pode acontecer devido à fraca quantidade de fragmentos específicos amplificados, e logo, à fraca intensidade de algumas bandas, o que leva a que nem sempre sejam facilmente visíveis. Tal pode decorrer da própria variabilidade intrínseca da técnica de PCR. Contudo, existem diversas bandas que surgem fielmente em ambas as amplificações de ADN de um mesmo indivíduo, sendo consideradas como bandas reprodutíveis e podendo ser utilizadas na discriminação de genótipos.

Do mesmo modo, podemos observar a existência de bandas reprodutíveis e não reprodutíveis entre indivíduos do mesmo clone. Por exemplo, nas amplificações de ADN dos clones com o genótipo M13, utilizando o *primer* (GTG)₅, é possível observar o aparecimento de uma banda de ≈ 800 bp nos indivíduos 1, 2 e 3 (PCR 1) e 1 e 3 (PCR 2), mas que não aparece no padrão de bandas do indivíduo 2 na segunda amplificação (PCR 2) (indicado com uma seta, Figura 9). Possivelmente, tal dever-se-á a factores intrínsecos da própria amostra (quantidade e qualidade do ADN) e da amplificação. Estes mesmos factores levaram a alguns perfis menos conseguidos e que tornam difícil a sua inclusão na análise. Por exemplo, a ausência de padrões de bandas que ocorre nos

indivíduos 1, 2 e 3 do genótipo M13, amplificados com o *primer* (ACC)₆ (PCR 1) pode dever-se a falhas na técnica de PCR (Figura 9).

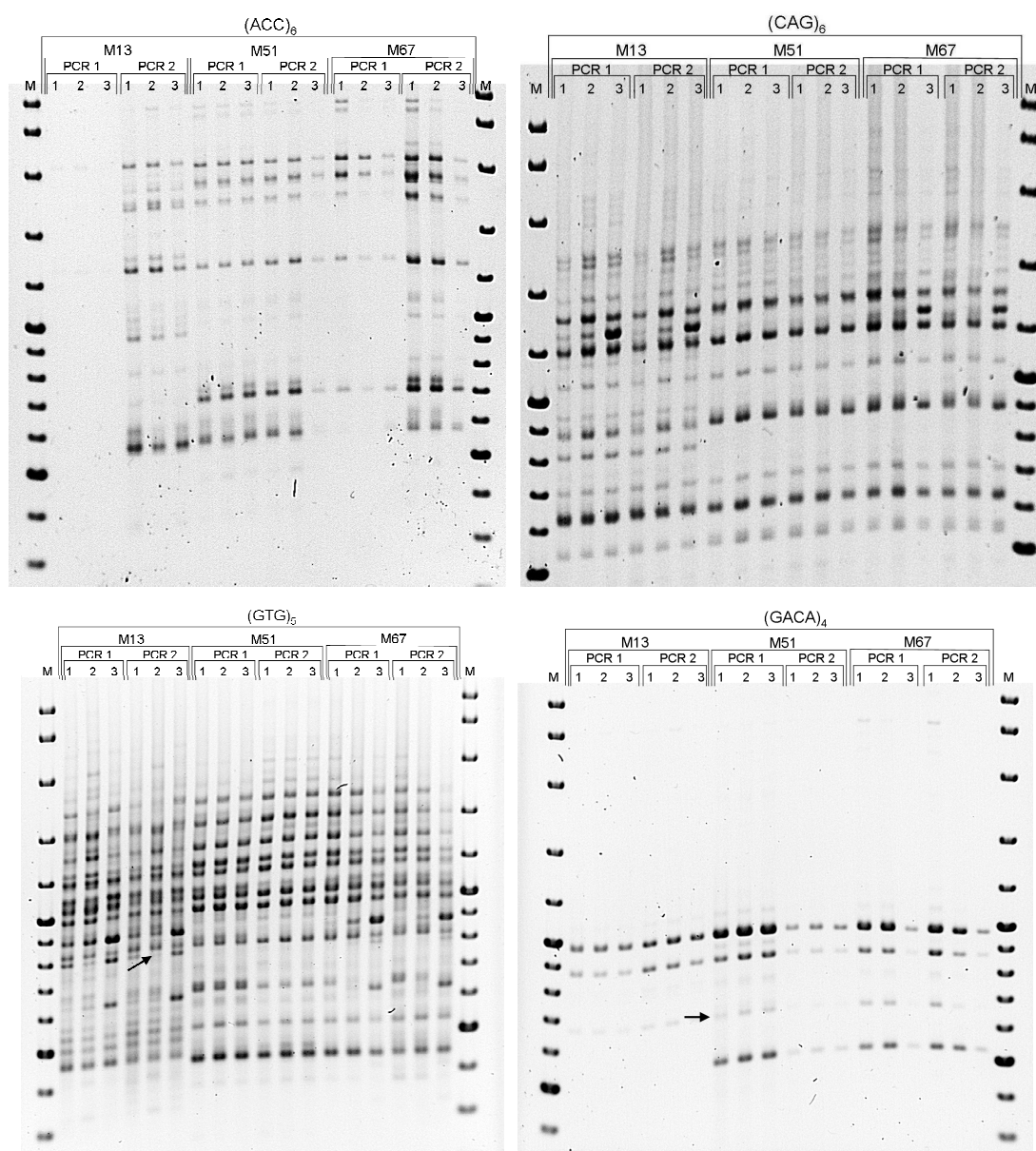


Figura 9. Padrão de bandas de amostras amplificadas com os *primers* (ACC)₆, (CAG)₆, (GTG)₅ e (GACA)₄. Como referência dos tamanhos dos fragmentos, é apresentado um marcador de peso molecular comercial (M – bandas intervaladas em 100 bps, começando em 1500 bps). Estão representados grupos de três indivíduos com o mesmo genótipo (1, 2 e 3) de três linhagens clonais putativas (M13, M51 e M67), tendo as amplificações sido feitas em duplicado (PCR 1 e PCR 2).

A partir dos padrões de *fingerprinting*, foi construído um dendrograma para os três genótipos da Lagoa de Melides (M13, M51 e M67), utilizando os padrões gerados pelos quatro *primers* ((CAG)₆, (ACC)₆, (GACA)₄ e (GTG)₅) e as duas amplificações [as segundas amplificações distinguem-se das primeiras pelo símbolo ('), colocado depois da amostra: por exemplo, M13-1 corresponde à primeira amplificação do indivíduo 1 com o genótipo M13; M13-1' corresponde à segunda amplificação do indivíduo 1 com o genótipo M13]. Na análise do dendrograma (Figura 10), é possível distinguir dois *clusters* principais (divergindo em cerca de 60%), correspondendo o primeiro aos indivíduos com o genótipo M13, e o segundo o que engloba os indivíduos com os genótipos M51 e M67. Estes dois genótipos separam-se posteriormente em dois *clusters* independentes (divergindo em cerca de 30%).

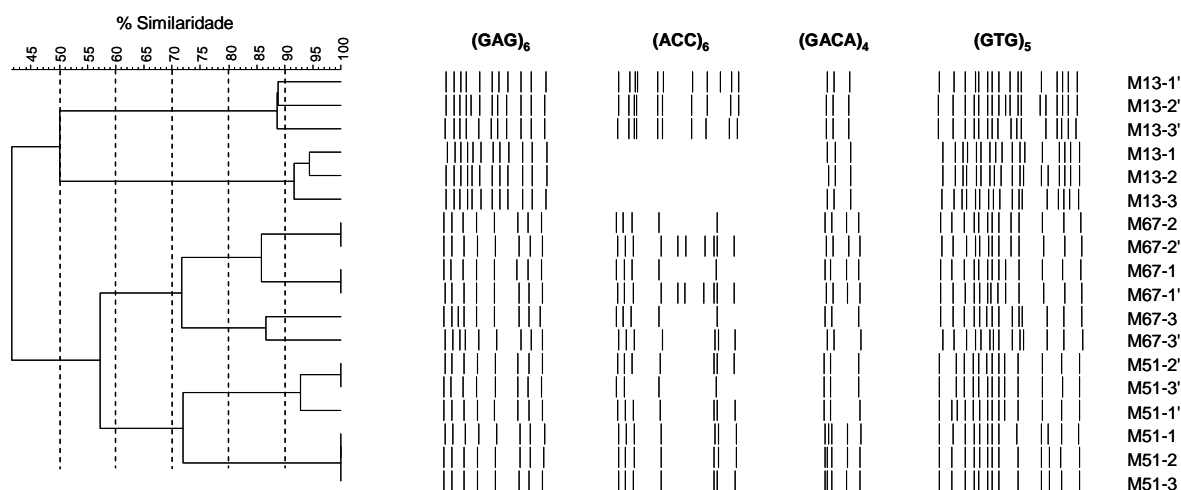


Figura 10. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de 3 indivíduos (2 amplificações por indivíduo) de 3 genótipos putativos da Lagoa de Melides, utilizando os *primers* (CAG)₆, (ACC)₆, (GACA)₄ e (GTG)₅.

Contudo, ao nível de similaridade a que é possível discriminar as linhagens clonais M51 e M67, os indivíduos com o genótipo M13 são divididos em dois *clusters*, que correspondem às duas amplificações realizadas com estas amostras, o que demonstra como esta técnica se encontra sujeita à variabilidade entre reacções. À medida que o grau de similaridade aumenta, é possível observar que o mesmo ocorre com os indivíduos com o genótipo M51 (separação por amplificação). Nos indivíduos com o genótipo M67 observa-se a prevalência

de variabilidade entre indivíduos sobre a variabilidade entre amplificações, o que levou à separação do indivíduo 3 num *cluster* diferente dos outros 2 indivíduos da mesma linhagem, de forma consistente entre amplificações (Figura 10).

De modo a ultrapassar a variabilidade existente entre amplificações, foi construído um dendrograma a partir somente das bandas presentes (representadas por 1 na matriz binária) em ambas as amplificações (Figura 11). Foram por isso excluídas da análise todas as bandas que não foram consistentemente amplificadas em ambos os duplicados. À semelhança do dendrograma anterior, formam-se inicialmente dois *clusters* (divergindo em cerca de 50%), os quais distinguem inequivocamente o genótipo M13 dos genótipos M51 e M67. A um nível de similaridade de 60% - 70%, já é possível observar três *clusters*, correspondendo aos três genótipos putativos estudados. Apesar dos marcadores utilizados terem conseguido discriminar com sucesso os 3 genótipos em estudo, ficou ainda evidente a variabilidade da técnica entre indivíduos (ainda assim, excluindo a variabilidade entre amplificações diferentes). Esta variabilidade, associada à quantidade e qualidade de ADN extraída de cada exemplar, terá que ser tida em conta no futuro, ajustando o nível de corte que permita abarcar alguma desta incerteza.

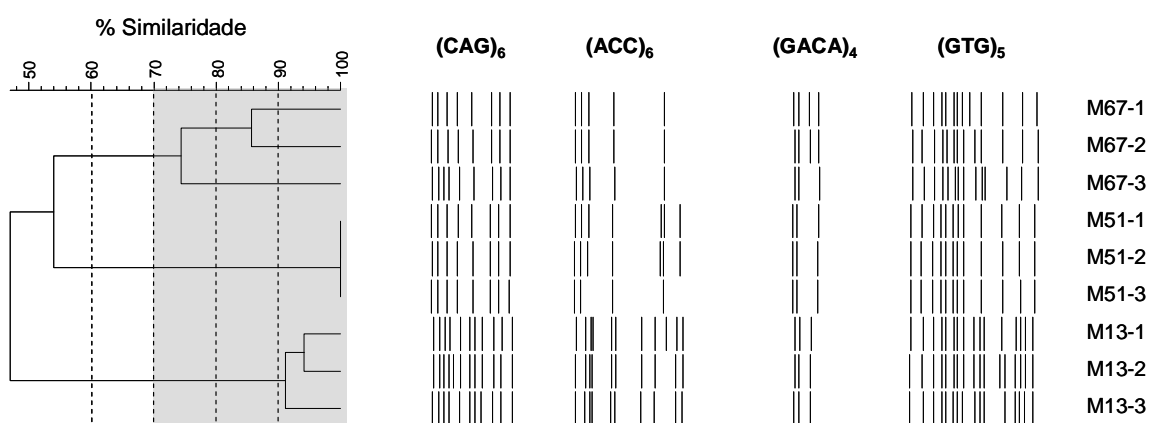


Figura 11. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de 3 indivíduos de 3 genótipos putativos da Lagoa de Melides, utilizando os *primers* $(CAG)_6$, $(ACC)_6$, $(GACA)_4$ e $(GTG)_5$. A área a cinza representa um nível de corte (em termos de similaridade) satisfatório para discriminar as 3 linhagens clonais.

No caso de *S. vetulus*, e para este conjunto de *primers* em particular, sob as condições experimentais descritas, o nível de corte de 70% de similaridade parece adequado (ver Figuras 10 e 11), desde que se tenha o cuidado de minimizar a variação entre amplificações (contabilizando apenas as bandas amplificadas de forma consistente). Deste modo, indivíduos que pertençam a *clusters* que divirjam em mais do que 30% poderão ser considerados indivíduos geneticamente diferentes, ao passo que indivíduos que pertençam a *clusters* com similaridade superior a 70% não poderão ser considerados geneticamente diferentes.

EXPERIÊNCIA 2: Arquitetura genética de populações de laboratório

Os padrões de *fingerprinting* dos 18 indivíduos (*S. vetulus*) de cada um dos três locais (M - Lagoa de Melides; LM – Lagoa de Mira; VM – Vala de Mira) foram também obtidos em duplicado. Como observado nos resultados anteriores (ver Experiência 1), foram observadas bandas não reprodutíveis entre amplificações (PCR 1 e PCR 2) para os mesmos indivíduos, não podendo estas ser utilizadas na discriminação de genótipos. Os padrões de bandas associados a cada indivíduo, *primer* e amplificação foram utilizados para a construção de diferentes dendrogramas (Figuras 12 a 16).

No dendrograma construído com as três populações (M, LM e VM), os três *primers* ((CAG)₆, (ACC)₆ e (GTG)₅) e ambas as amplificações (duplicados), são visíveis três grandes *clusters*, cada um correspondendo a uma população (zonas maiores sombreadas em três tons de cinzento; Figura 12). À primeira vista, os marcadores utilizados parecem ter poder discriminatório para identificar um primeiro nível de variabilidade correspondente à diferenciação entre populações. No entanto, destaca-se destes três grupos um quarto *cluster* misto (LM43', LM44', LM50', LM53', M7, M7', LM64', e VM69) e um pequeno grupo de indivíduos pertencentes à Lagoa de Mira (LM51, LM15', LM48 e LM25). Contudo, os duplicados das amplificações respectivas destas amostras encontram-se nos *clusters* maiores (excepção feita aos genótipos M7 e VM7), juntamente com os outros indivíduos da população correspondente. Veremos adiante que, ao

considerar apenas as bandas presentes em ambas as amplificações (duplicados), as incoerências inter-populacionais são parcialmente amenizadas.

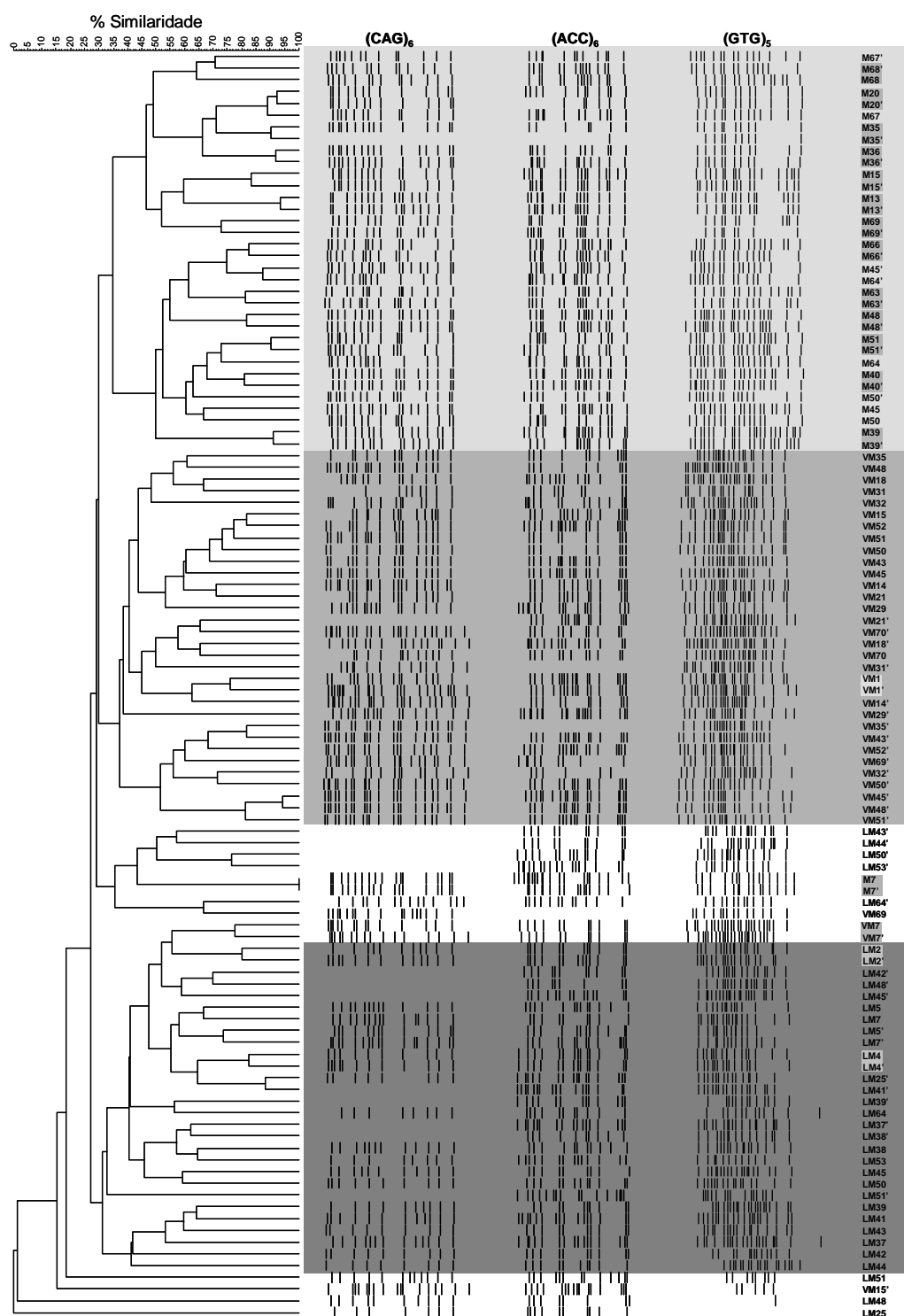


Figura 12. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de diferentes indivíduos da Lagoa de Melides (M), Lagoa de Mira (LM) e Vala de Mira (VM) utilizando duas amplificações com os *primers* (CAG)₆, (ACC)₆, e (GTG)₅.

A porção do dendrograma respeitante à população M apresenta uma estrutura que se aproxima da ideal (do ponto de vista técnico) uma vez que muitas das duas amplificações (duplicados) de cada indivíduo (M68/M68'; M20/M20'; M35/M35'; M36/M36'; M15/M15'; M13/M13'; M69/M69'; M66/M66'; M63/M63'; M48/M48'; M51/M51'; M40/M40' e M39/M39': zonas sombreadas a cinzento escuro) constituem um só *cluster* (Figura 12).

Tal não é observável na maioria dos restantes casos nas outras duas populações, onde apenas se formam três grupos de duas amplificações (VM1/VM1'; LM2/LM2' e LM4/LM4'). Já anteriormente (ver Experiência 1) se havia observado uma grande variabilidade entre amplificações da mesma amostra, e um maior poder discriminatório destes marcadores moleculares quando consideradas apenas as bandas presentes em ambos os duplicados (i.e. fragmentos amplificados de forma consistente em duas reacções independentes). Para reduzir esta incerteza, repetimos a abordagem mais conservadora que havíamos utilizado anteriormente (Experiência 1), levando em consideração para efeitos da análise de classificação (*clustering*) apenas as bandas amplificadas de forma consistente para cada amostra. Este novo dendrograma é apresentado na Figura 13.

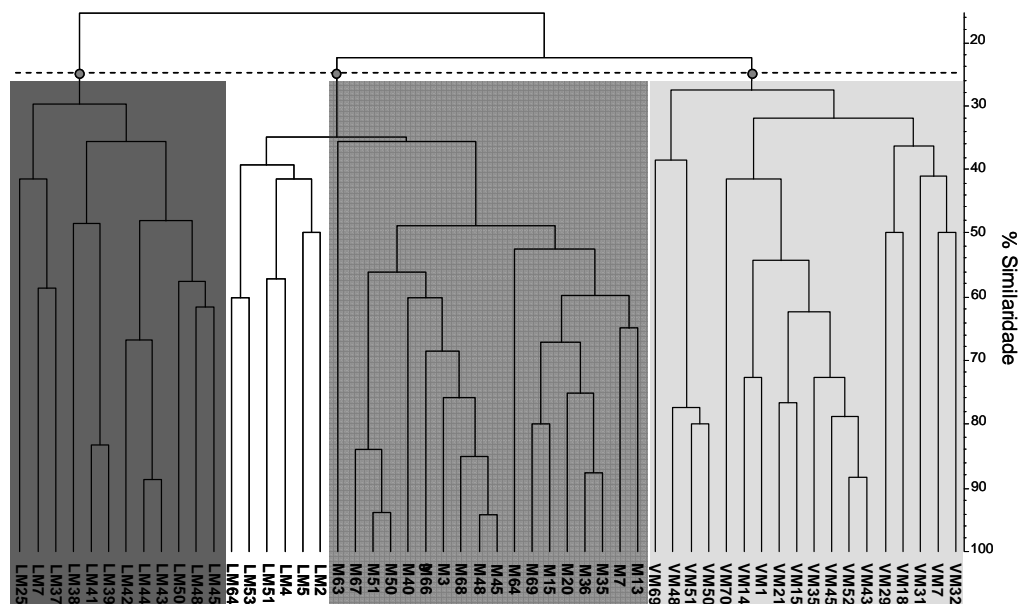


Figura 13. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de diferentes indivíduos da Lagoa de Melides (M), Lagoa de Mira (LM) e Vala de Mira (VM) utilizando os *primers* (CAG)₆, (ACC)₆, e (GTG)₅.

Analisando a arquitectura ou estrutura genética das populações de laboratório, são visíveis três *clusters* bem distintos, que correspondem aos indivíduos das três populações. Os genótipos extremos que anteriormente se distinguíam dos restantes *clusters* (Figura 12) aparecem agora bem integrados (Figura 13). Um pequeno grupo de genótipos da Lagoa de Mira (LM) apresenta uma maior similaridade com os genótipos da Lagoa de Melides (M), tendo ficado incluído no mesmo grupo (*cluster* do meio da Figura 13). Esta constitui a única falha na resolução (discriminação entre populações) dos marcadores moleculares utilizados, na medida em que não é expectável haver fluxo genético entre populações tão distantes. De forma a analisar a arquitectura e diversidade genética dos três locais amostrados, foram construídos dendrogramas para cada população individual, a partir desta análise global, que teve em conta apenas as bandas consistentemente amplificadas.

O dendrograma para a população da Lagoa de Melides (M) (Figura 14) apresenta uma arquitectura genética mais complexa que a apresentada nos dendrogramas das populações da Lagoa de Mira (LM) e da Vala de Mira (VM) (Figuras 15 e 16). Os marcadores seleccionados resultaram em perfis com graus de similaridade grande entre os diferentes indivíduos amostrados nesta população (M), sendo possível distinguir 3 grupos distintos (divergindo acima de 40%), que se decompõem progressivamente em vários *clusters* muito próximos.

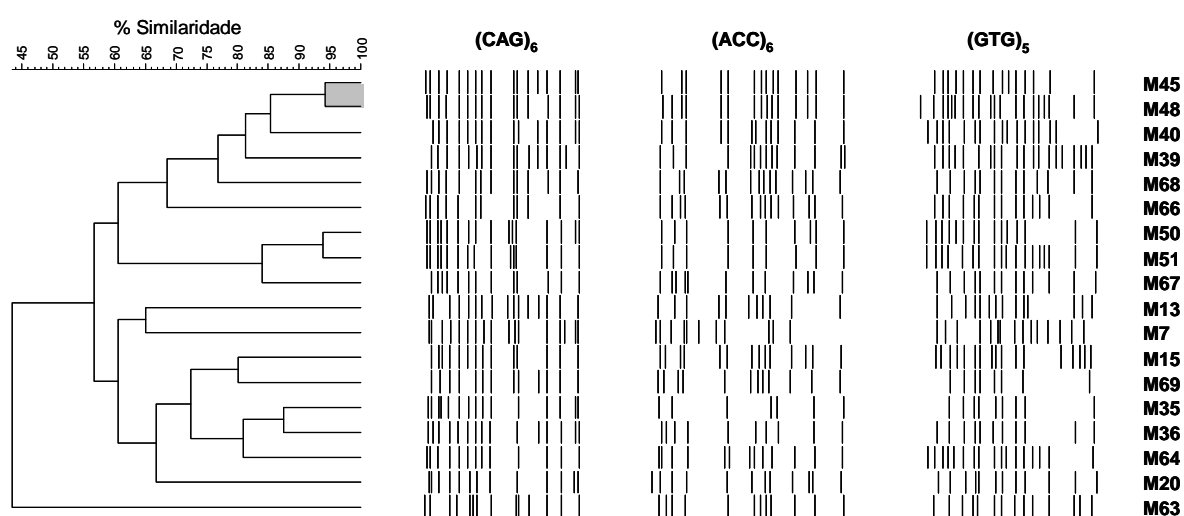


Figura 14. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de 18 indivíduos da Lagoa de Melides (M), utilizando os *primers* $(CAG)_6$, $(ACC)_6$ e $(GTG)_5$.

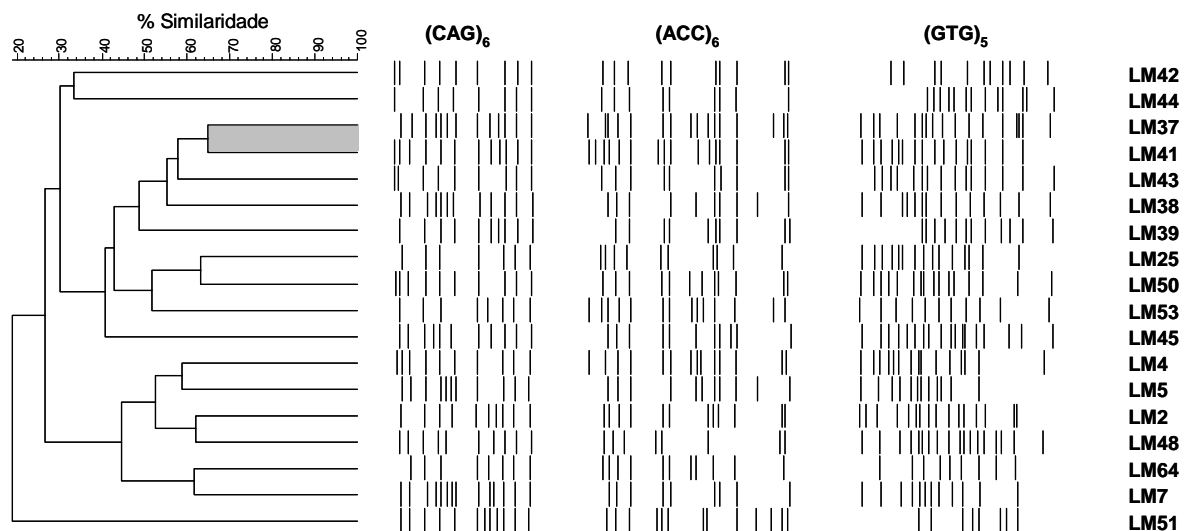


Figura 15. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de 18 indivíduos da Lagoa de Mira (LM), utilizando os *primers* $(CAG)_6$, $(ACC)_6$ e $(GTG)_5$.

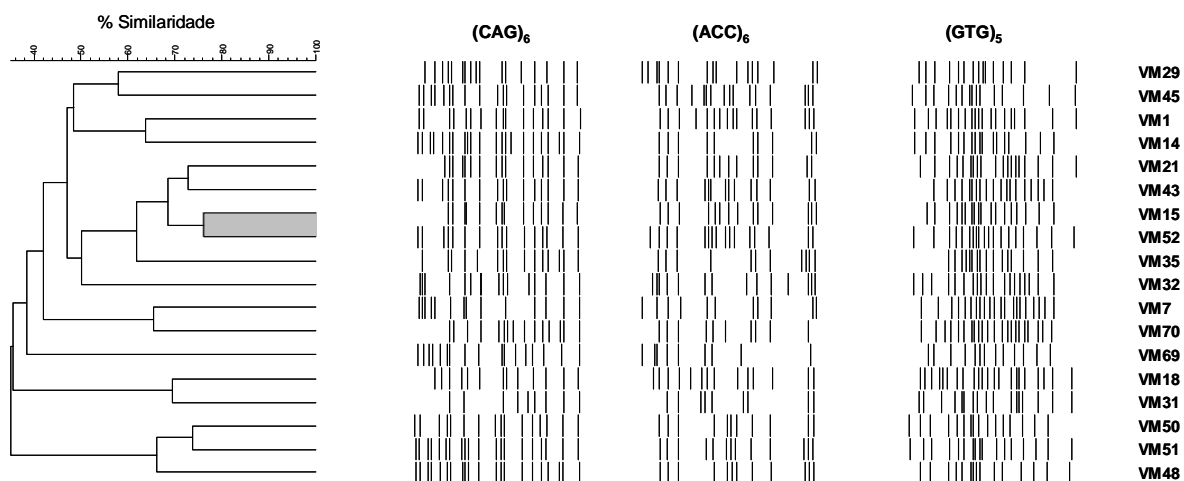


Figura 16. Dendrograma dos padrões de *fingerprinting* de 18 indivíduos da Vala de Mira (VM), utilizando os *primers* $(CAG)_6$, $(ACC)_6$ e $(GTG)_5$.

Dado que existe um grau de incerteza associado à técnica propriamente dita, definiram-se vários níveis de corte, em termos de similaridade. Deste modo, foi decomposta a arquitetura genética de cada população, assumindo genótipos hipotéticos para cada nível de similaridade considerado (40%, 50%, 60%, 70%, 80% e 90%), apresentando-se estes valores na Tabela 2. A arquitetura genética mais complexa da população da Lagoa de Melides (M) levou a uma menor diferenciação de genótipos, como consequência de uma elevada similaridade

entre indivíduos e reduzida variabilidade genética nesta população. Em contraste, os *clusters* obtidos para as populações da Lagoa de Mira (LM) e Vala de Mira (VM) revelaram maior dissimilaridade entre os indivíduos, logo maior variabilidade genética. Considerando o nível de corte (70%) definido na experiência anterior (que permite abarcar alguma variabilidade intrínseca da técnica usada; ver Experiência 1), é possível fazer uma análise comparativa das 3 populações. Assim, a população LM é a mais diversificada com 18 genótipos em 18 possíveis, sendo seguida por VM com 15 genótipos diferentes em 18 possíveis. Na população M, confirmando o que se havia dito anteriormente, apenas foi possível distinguir 8 genótipos em 18 indivíduos, para o nível de corte predefinido.

Tabela 2. Genótipos hipotéticos obtidos a diferentes níveis de corte de similaridade, para as três populações amostradas (M – Lagoa de Melides; LM – Lagoa de Mira; VM – Vala de Mira; n = 18 em cada população).

% Similaridade	M	LM	VM
40	1	5	4
50	2	9	8
60	3	14	9
70	8	18	15
80	11	18	18
90	16	18	18

Numa análise posterior, foram identificados os *clusters* mais pequenos (ver *clusters* sombreados nas Figuras 14, 15 e 16) e, a título exemplificativo, registadas as bandas comuns aos dois indivíduos pertencentes ao referido *cluster* e as bandas polimórficas (que surgem exclusivamente num indivíduo ou no outro) (Tabela 3). Nas populações da Lagoa de Mira (LM) e da Vala de Mira (VM), cerca de 27% e 24% do total de bandas presentes no par de organismos seleccionado são polimórficas, respectivamente. Na população da Lagoa de Melides (M), cerca de 23% das bandas presentes no par de organismos seleccionado indicam polimorfismos. Contudo, apenas na população LM é possível distinguir este par de indivíduos como genótipos diferentes (ver Figuras 14-16), tendo como base o nível de corte de 70%.

Tabela 3. Registo das bandas comuns e exclusivas (bandas polimórficas) a cada par de indivíduos seleccionado (ver Figuras 7-9) das três populações amostradas.

		(CAG) ₆	(ACC) ₆	(GTG) ₅	Total
M	Exclusivo M45	1	0	2	3
	Exclusivo M48	0	1	8	9
	Comuns	16	14	13	41
LM	Exclusivo LM37	2	2	4	8
	Exclusivo LM41	1	2	3	6
	Comuns	11	14	13	38
VM	Exclusivo VM15	1	1	2	4
	Exclusivo VM52	3	3	3	9
	Comuns	13	13	16	42

Discussão

Neste trabalho, foi utilizada a técnica de MSP-PCR cuja utilidade tem sido demonstrada em diversos estudos de sistemática e diferenciação de estirpes/raças dentro da mesma espécie noutros taxa (Hantula & Muller 1997, Meng & Chen 2001, Rodrigues *et al.* 2004, Alves *et al.* 2007). O objectivo central era o de testar a eficácia destes marcadores moleculares na decomposição da arquitectura genética de diversas populações de *Simocephalus*, mormente na discriminação de genótipos.

Os dendrogramas construídos neste estudo revelaram uma grande variabilidade associada à amplificação (dissimilaridade acentuada entre amplificações diferentes do mesmo indivíduo com o mesmo *primer*), assim como alguma variabilidade entre indivíduos (dissimilaridade entre indivíduos com o mesmo genótipo), corroborando trabalhos anteriores que mostravam a elevada sensibilidade desta técnica a variações nas condições de reacção (Weising *et al.* 1995). A experiência 1 sugere inclusivamente que a variabilidade associada à amplificação (mesmo indivíduo) é maior do que a variabilidade entre indivíduos da mesma linhagem. De forma semelhante à técnica de RAPD, a concentração de *primer*, $MgCl_2$ e a temperatura de *annealing* influenciam de forma considerável a qualidade dos padrões de bandas obtidos com a técnica de MSP-PCR (Roux 1995, Weising *et al.* 1995). Estas pequenas variações podem levar ao aparecimento de bandas ambíguas (ora aparecem, ora não aparecem), criando dificuldades na análise dos padrões de *fingerprinting* e na discriminação de genótipos baseada nas diferenças entre esses mesmos padrões. Fica assim demonstrada novamente a necessidade da optimização da técnica (ver Capítulo 1). Para além da optimização já referida da temperatura de *annealing* e da concentração de $MgCl_2$, uma medida proposta para reduzir o arrasto (vulgo *smear*) presente nalgumas corridas de produtos de PCR (provável consequência do elevado número de locais putativos complementares aos *primers* utilizados e o qual pode dificultar a visualização e distinção das bandas) é a utilização de

primers com pequenas sequências específicas ancoradas, de forma a haver uma maior especificidade das bandas amplificadas (Zietkiewicz *et al.* 1994). Uma outra medida a utilizar, de forma a obter uma maior reprodutibilidade dos padrões de bandas obtidos é a técnica de *touchdown* PCR. Esta técnica representa uma abordagem um pouco diferente, em que em vez de se determinar a temperatura de *annealing* óptima para o *primer* utilizado, é utilizada uma gama decrescente de temperaturas de *annealing* em diferentes ciclos de amplificação (Roux 2002). O objectivo é seleccionar uma gama ampla de temperaturas de *annealing* que começa acima da temperatura de *melting* do *primer* e acaba abaixo desta. Deste modo, a primeira hibridização cadeia de ADN-*primer* e sua extensão será a mais específica, originando presumivelmente os segmentos amplificados desejados, e obtendo deste modo uma maior especificidade das bandas amplificadas e maior reprodutibilidade (Roux 2002). Estamos actualmente a testar no laboratório esta variante (*touchdown* PCR), juntamente com *primers* ancorados, e temos tido algum sucesso no aumento da especificidade da amplificação.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que uma forma de contornar a variabilidade associada à amplificação é considerar apenas as bandas que surgem de forma consistente entre amplificações de ADN do mesmo indivíduo (tendo-se mantido contudo a variabilidade entre indivíduos). Esta abordagem enfatiza a preocupação e importância de uma optimização prévia da técnica e da obtenção de pelo menos duas amplificações (i.e. reacções em duplicado) com sucesso para cada indivíduo. Devido a esta variabilidade intrínseca à técnica, surge a necessidade de serem tomadas algumas medidas de forma a maximizar o nível de confiança na diferenciação de genótipos a partir dos dendrogramas construídos. Uma dessas formas é a utilizada neste trabalho, que passa por uma abordagem conservadora, quer na selecção das bandas a analisar, quer na determinação do nível de corte de similaridade. Uma segunda medida seria o uso de métodos estatísticos, nomeadamente testes de permutação e re-amostragem (Arnaud-Haond & Belkhir 2007, Thielsch *et al.* 2009). Este tipo de análise é o mais indicado para este tipo de estudo; contudo a maioria destes testes aplicam-se a marcadores codominantes, não sendo ainda bem conhecida a sua fiabilidade para marcadores dominantes.

A aplicação da técnica a três populações distintas (Lagoa de Melides - M, Lagoa de Mira - LM e Vala de Mira - VM) revelou diferenciação genética entre as três populações amostradas, mesmo entre as populações com algum grau de conectividade (LM e VM). Esta diferenciação vai de encontro à hipótese apresentada por De Meester *et al.* (2002), a qual sugere que diversos factores cumulativos (como a influência dos genótipos fundadores, o rápido crescimento populacional, a adaptação local, e a monopolização dos recursos) levam a uma redução dos níveis de fluxo de genes entre as populações, acentuando a sua diferenciação genética. Esta hipótese da monopolização tem subjacente um mecanismo de resistência à entrada de novos genótipos (não adaptados) por parte dos genótipos residentes (adaptados àquele *habitat* específico, e reflexo do *pool* genético fundacional). Tal reforça a ideia de que os lagos de água doce se comportam como ilhas, do ponto de vista de isolamento genético das populações de cladóceros que aí habitam. Os marcadores moleculares aqui utilizados permitiram, salvo alguns casos, distinguir e agrupar as 3 populações distintas com sucesso.

Na análise dos dendrogramas construídos de forma independente para cada população, e considerando o nível de corte de 70% de similaridade, foi possível distinguir 8, 15 e 18 genótipos (em 18 indivíduos) das populações M, VM e LM, respectivamente. Embora a população da Lagoa de Melides (M) apresente um menor número de genótipos, indicando uma menor variabilidade genética, nas populações VM e LM o número de genótipos distinguido revela uma forte diversidade clonal. Tendo em conta que as populações amostradas são populações predominantemente partenogenéticas (considerando a altura do ano em que foram capturados e o facto de em nenhum exemplar capturado se ter observado a presença de ovos sexuais), este grau de diversidade genética em cada população revela uma importância acentuada da fase sexuada e do banco de ovos de resistência na dinâmica populacional (Thielsch *et al.* 2009). Como tal, parece haver um reduzido efeito da selecção clonal (De Meester *et al.* 2006, Hembre & Megard 2006) na diversidade genética. Contudo, a erosão clonal (redução do número de genótipos na população por selecção dos genótipos mais aptos para as condições locais e momentâneas e mais bem sucedidos

assexuadamente (De Meester *et al.* 2006) poderá não ter ainda ocorrido aquando da amostragem. Na realidade, as populações foram amostradas a meio da época de crescimento, quando há ainda uma grande contribuição do banco de ovos de resistência. Adicionalmente, deve referir-se que o número de exemplares analisados nas 3 populações foi muito reduzido (apenas 18 indivíduos por população), dado o pouco tempo disponível. Ainda assim, o elevado grau de diversidade genética observado corrobora as observações em outras populações de dafnídeos (Thielsch *et al.* 2009).

Os nossos dados demonstram assim a utilidade da técnica de MSP-PCR na diferenciação de linhagens clonais cultivadas em laboratório. Embora outros métodos tenham vindo a ser desenvolvidos ao longo de tempo, a técnica de MSP-PCR apresenta vantagens do ponto de vista logístico e financeiro. Caracteriza-se por ser uma técnica rápida e simples para a visualização de polimorfismos ao nível inter- e intra-específico, tendo sido já demonstrada a sua capacidade de detecção de polimorfismos genéticos em *taxa* eucarióticos (Weising *et al.* 1995). Diversos autores compararam esta técnica com outras já desenvolvidas (como RAPD, AFLP e RAMP), tendo concluído que a técnica de MSP-PCR é das mais sensíveis na detecção de polimorfismos, sendo mais eficiente e económica (Czembor & Arseniuk 1999, Meng & Chen 2001, De León & Jones 2004). Pelo facto de serem utilizadas regiões ubíquas de genomas eucarióticos, repetitivas e altamente variáveis (microsatélites ou SSR's) para o desenho de *primers*, não existe a necessidade de se conhecer *a priori* as sequências que flanqueiam a região a amplificar (Cristescu *et al.* 2006). Por outro lado, os nossos resultados mostraram uma elevada variabilidade intrínseca da técnica, associada à amplificação e entre indivíduos, tornando necessária uma optimização da técnica de forma a minimizar a incerteza na análise.

Neste trabalho foram utilizados diversos *primers*, tendo sido escolhidos os três mais informativos para a diferenciação de genótipos nesta espécie de dafnídeos. A utilização de mais *primers* é assim necessária para a obtenção de mais informação e maior poder discriminatório, sendo necessário estabelecer um compromisso entre o número de marcadores e a informação que eles proporcionam, uma vez que a análise de uma grande quantidade de *primers* torna

a técnica mais morosa e dispendiosa. Presentemente, encontramos-nos a explorar novos *primers* em *Simocephalus* e *Daphnia*, existindo a possibilidade dos marcadores utilizados no presente estudo virem a ser substituídos por outros mais informativos ou mais reprodutíveis. A procura e teste de novos *primers* é também importante, na medida em que diferentes *primers* são mais informativos que outros dependendo da espécie (por exemplo, o *primer* (CAG)₆ revelou-se não funcional para populações do género *Daphnia*, sendo no entanto útil para *Simocephalus*).

O sucesso deste trabalho na diferenciação de linhagens clonais mantidas em laboratório perspectiva elevadas potencialidades na utilização regular desta técnica em estudos de genética de populações naturais de Daphniidae. A sua utilização em linhagens de laboratório é vantajosa, já que permite utilizar diversos organismos da mesma linhagem até obter perfis reprodutíveis que permitam distinguir genótipos com o maior grau de certeza possível (quer em cultura, quer em experiências usando cenários de exposições multi-clonais). Esta abordagem não é possível em amostras de campo preservadas (onde um indivíduo tem de ser tratado com um genótipo putativo); todavia, com uma adequada optimização da técnica (condições de reacção, número de marcadores) e alguns cuidados na análise dos padrões de *fingerprinting* (ver acima), o MSP-PCR (ou ISSR) poderá tornar-se uma caixa de ferramentas interessante e acessível para decompor a arquitectura genética de populações naturais de dafnídeos.

Referências bibliográficas

- Alonso M. 1996. *Crustacea, Branchiopoda*: Museo nacional de ciencias naturales Madrid
- Alves A, Phillips A, Henriques I, Correia A. 2007. Rapid differentiation of species of Botryosphaeriaceae by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112-21
- Antunes S. 2001. Variabilidade clonal de respostas crônicas de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro, Aveiro. 71 pp.
- Arnaud-Haond S, Belkhir K. 2007. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* 7: 15-7
- Baird D, Soares AMVM, Girling A, Barber I, Bradley MC, Calow P. 1989. The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicity tests: problems and prospects. In *Proceedings of the first European conference on ecotoxicology*, ed. H Lokke, H Tyle, F Bro-Rasmussen, pp. 144-8. Lyngby, Denmark: Technical University
- Balloux F, Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-65
- Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-15
- Brede N, Thielsch A, Sandrock C, Spaak P, Keller B, et al. 2006. Microsatellite markers for European *Daphnia*. *Molecular Ecology Notes* 6: 536-9
- Conner J, Hartl D. 2004. *A Primer of Ecological Genetics*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Inc
- Cristescu M, Colbourne J, Radivojac J, Lynch M. 2006. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics* 88: 415-30
- Culley TM. 2005. Population Genetic Analysis of ISSR Data. Disponível online em Julho 2009 em <http://bioweb.ad.uc.edu/faculty/culley/Protocols.htm>.

- Czembor P, Arseniuk E. 1999. Study of Genetic Variability Among Monopycnidial and Monopycnidiospore Isolates Derived from Single Pycnidia of *Stagonospora* ssp. and *Septoria tritici* with the use of RAPD-PCR, MP-PCR and rep-PCR Techniques. *J. Phytopathology* 147: 539-46
- De León JH, Jones WA. 2004. Detection of DNA Polymorphisms in *Homalodisca coagulata* (Homoptera: Cica dellidae) by Polymerase Chain Reaction-Based DNA Fingerprinting Methods. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 574-85
- De Meester L, Gómez A, Okamura B, Schwenk K. 2002. The Monopolization Hypothesis and the dispersal-gene flow paradox in aquatic organisms. *Acta Oecologica* 23: 121-35
- De Meester L, Vanoverbeke J, Gelas KD, Ortells R, Spaak P. 2006. Genetic structure of cyclic parthenogenetic zooplankton populations - a conceptual framework. *Archiv Fur Hydrobiologie* 167: 217-44
- Elendt B-P, Bias W-R. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water research* 24: 1157-67
- EPA. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms.
- Grasela JJ, McIntosh AH. 2003. Application of inter-simple sequence repeats to insect cell lines: identification at the clonal and tissue-specific level. *Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 39: 356-63
- Hantula J, Muller MM. 1997. Variation within *Gremmeniella abietina* in Finland and other countries as determined by Random Amplified Microsatellites (RAMS). *Mycol. Res.* 101: 169-75
- Hembre L, Megard R. 2006. Direct and indirect effects of predation on the genetic structure of a *Daphnia* population. *Journal of Plankton Research* 28: 1129-41
- Lynch M, Milligan B. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers *Molecular Ecology* 3: 91-9

- Meng X, Chen W. 2001. Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown stem rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol.Res.* 105: 936-40
- Riltand C, Ritland K. 2000. DNA - Fragment Markers in Plants. In *Molecular Methods in Ecology*, ed. AJ Baker, pp. 208-34. Oxford, UK: Blackwell Science
- Rodrigues KF, Sieber TN, Grunig CR, Holdenrieder O. 2004. Characterization of *Guignardia mangiferae* isolated from tropical plants based on morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8S-ITS2 sequences. *Mycol.Res.* 102: 45-52
- Roux KH. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. *Genome Research* 4: 185-94
- Roux KH. 2002. Single-Step PCR Optimization Using Touchdown and Stepdown PCR Programming. In *PCR Cloning Protocols - 2nd edition*, ed. B-Y Chen, HW Janes, pp. 31-6. Totowa, NJ: Humana Press
- Schierwater B, Ender A, Schroth W, Holzmann H, Diez A, et al. 1997. Arbitrarily amplified DNA in ecology and evolution. In *DNA Markers - Protocols, applications and overviews.*, ed. G Caetano-Anollés, PM Gresshoff, pp. 313-30. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Schwenk K, Posada D, Hebert P. 2000. Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 1833-42
- Schwenk K, Sand A, Boersma M, Brehm M, Mader E, et al. 1998. Genetic markers, genealogies and biogeographic patterns in the cladocera. *Aquatic Ecology* 32: 37-51
- Scribner KT, Pearce JM. 2000. Microsatellites: Evolutionary and Methodological Background and Empirical Applications at Individual, Population and Phylogenetic Levels. In *Molecular Methods in Ecology*, ed. AJ Baker, pp. 235-73. Oxford, UK: Blackwell Science

- Seidendorf B, Boersma M, Schwenk K. 2007. Evolutionary stoichiometry: The role of food quality for clonal differentiation and hybrid maintenance in a *Daphnia* species complex. *Limnology and Oceanography* 52: 385-94
- Thielsch A, Brede N, Petrusek A, Meester Ld, Schwenk K. 2009. Contribution of cyclic parthenogenesis and colonization history to population structure in *Daphnia*. *Molecular Ecology* 18: 1616-28
- Weising K, Atkinson RG, Gardner RC. 1995. Genomic Fingerprinting by Microsatellite-primed PCR: A Critical Evaluation. *Genome Research* 4: 249-55
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176-83